

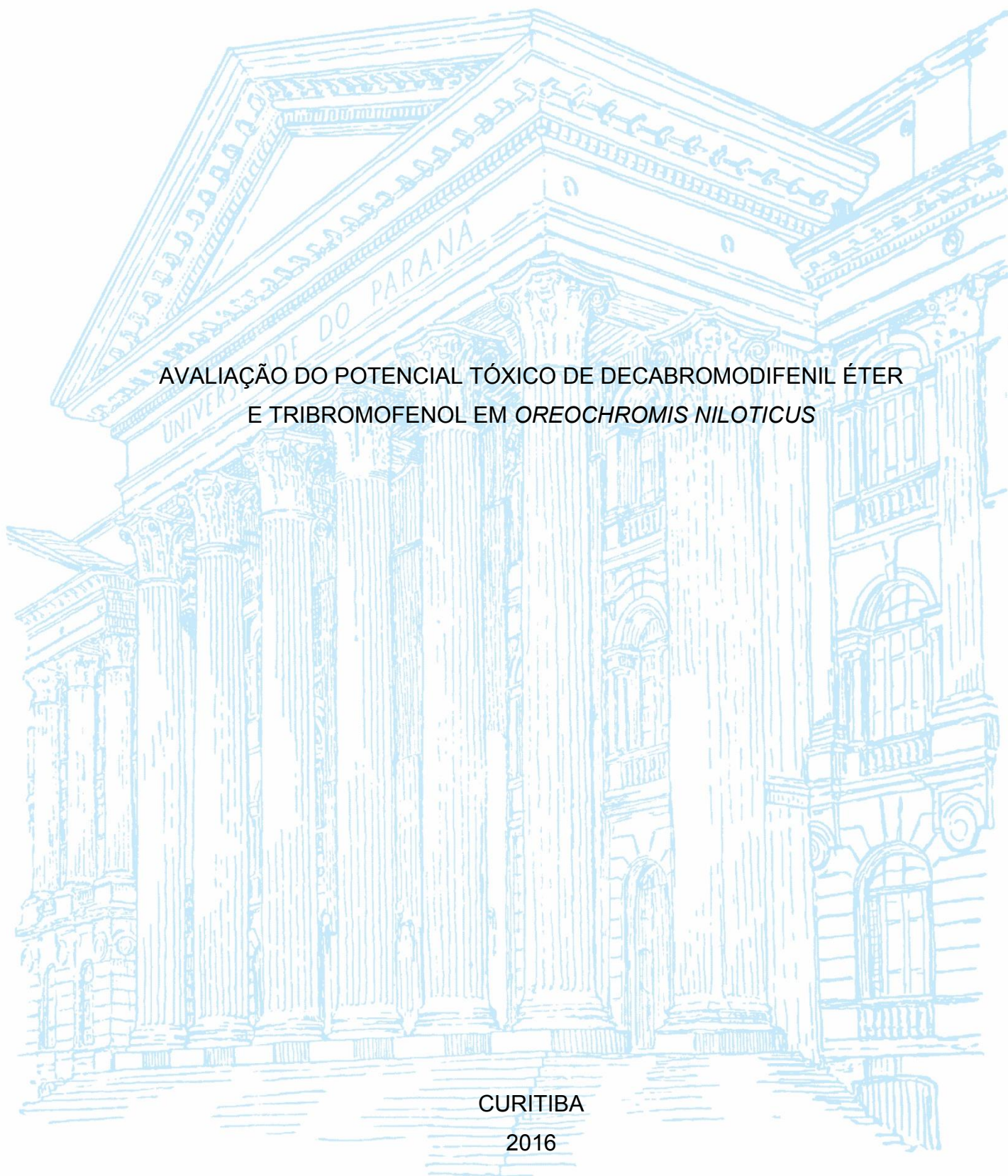
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANDIE ANTUNES BOZZA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DE DECABROMODIFENIL ÉTER
E TRIBROMOFENOL EM *OREOCHROMIS NILOTICUS*

CURITIBA

2016



DANDIE ANTUNES BOZZA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DE DECABROMODIFENIL ÉTER
E TRIBROMOFENOL EM *OREOCHROMIS NILOTICUS*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira
Ribeiro

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Bozza, Dandie Antunes

Avaliação do potencial tóxico de decabromodifenil éter e tribromofenol em *Oreochromis niloticus*. / Dandie Antunes Bozza. – Curitiba, 2016.
80 p.: il.

Orientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Toxicidade 2. Ciclídeos 3. Biomarcadores I. Título II. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira, 1960- III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 571.95

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Examinador/Afiliação

Assinatura

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Wanessa Ramsdorf
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Profa. Dra. Lucélia Donatti
Universidade Federal do Paraná

Suplente:

Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco
Universidade Federal do Paraná

Após arguir o mestrando **Dandie Antunes Bozza**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Avaliação do potencial tóxico de Decabromodifenil Éter e Tribromofenol em *Oreochromis niloticus*", são de parecer favorável à Aprovação do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.
A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Março de 2016



Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Coord. do Programa de Pós-Graduação
Em Biologia Celular e Molecular
Matr./UFPR 104132

Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Odario por ter me criado sozinho desde os 12 anos, desistindo de muitas coisas para poder me oferecer os melhores estudos. Ensinou-me a ser uma pessoa honrada e generosa, assim como ele sempre foi.

A minha avozinha Holanda que sempre me apoiou e cuidou de mim, preparando as comidas maravilhosas.

Ao meu avozinho Florindo (*in memorian*) que nos deixou em 2009, no início da faculdade, e que sempre deixará saudades de seus ensinamentos e seus cuidados.

As minhas tias Estel e Cris que sempre me apoiaram e ajudaram em tudo o que eu precisei até hoje.

Aos meus padrinhos/tios Gloria e Ivo por sempre serem meus amigos e pela ajuda e apoio que me deram todos esses anos.

Aos meus primos Soelen e Marcos pela amizade.

Ao meu orientador Profº Drº Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro por ter me acolhido no laboratório e ter acreditado e confiado em mim nesses seis anos. Deixo de ser seu orientado a partir de agora, mas sempre irei colocá-lo em meus agradecimentos por ter me mostrado o mundo da ciência e ter aberto meus olhos ao mundo.

A Ana Carolina por toda a ajuda que me deu em meus experimentos em Paulo Lopes. Acredito que sem ela as coisas seriam bem mais difíceis.

A Patrícia, minha IC e protegida, por todo seu carinho e amizade e ajuda com as lâminas histológicas.

A Nilce, Maristela e Alini por terem me ajudado nas coletas, na montagem dos experimentos. Saibam que sem a ajuda de vocês as coisas teriam sido difíceis.

Aos membros quarteto fantástico Dani, Andressa e Samuel pela amizade, irmandade e pelas risadas. Amigos que levarei para toda a vida.

A Ludiana pela amizade, pelos choros e pelas noites jogando online.

As minhas colegas de laboratório Flavia, Renata, Halina, Débora, Yvanna, Marcele, Helena, Manuela e aos meus colegas Gabriel e Benísio pela amizade e por toda ajuda que me deram.

Ao Profº Drº Francisco (o Chico) pelos ensinamentos, ajudas e pela amizade.

Ao Profº Drº Marco Randi pelos ensinamentos e ajudas. Pelas brigas que as vezes temos e pelos xingos que trocamos (claro que tudo de brincadeira!!!) e por ter me ensinado a não levar tudo o que ele fala a sério. E claro, não podia faltar o mais importante, a ajuda na estatística.

A Gisleine pelo companheirismo e amizade que tivemos desde o início do mestrado. Sempre apoiando nas horas de estudo.

Aos “Cell Rangers” Thaylise, Gustavo, Daniel, Jeniffer pelos bons happy hours e pelo compartilhamento das alegrias e sofrimentos que o mestrado nos trouxe.

A Profª Drª Sônia, minha mãe adotiva na universidade, por todos os ensinamentos, conselhos, conversas, broncas e cafezinhos no laminário. Sempre que um problema surgiu a Soninha sempre esteve lá para me ajudar.

A Profª Drª Maritana, pela amizade e ajuda.

Aos meus amigos que nessa trajetória sempre estiveram presentes, em especial a Jéssica, Julian, Renato, Angie, Anna, Rennatho, Diego, Thaís.

Ao senhor Juan Esquivel, um panamenho muito alto-astral, que cedeu sua estrutura e os peixes para que pudesse executar esses experimentos.

Ao Juan Muelbert (“Juant”) pelo apoio.

Aos funcionários da Piscicultura Panamá, em especial o Marcos Nuñez, Marcos Catenacci, Marcio e Lídio por me ajudarem com os manejos e cuidados com os peixes.

A Piscicultura Panamá pela estrutura.

Ao Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA) da Unioeste, em especial ao Profº Drº Robie Bombardelli por ter cedido a estrutura e realizar o experimento piloto.

A todos os professores que ao longo da minha vida acadêmica, não se limitaram apenas a serem professores, e sim verdadeiros mestres.

Aos professores do Dpto. de Biologia Celular pelos ensinamentos.

Aos Funcionários técnico-administrativos da Universidade, em especial a Marlene, Miriam, Herculano (Seu nino) e Eliane, por toda a ajuda e dedicação que tiveram (e que continuam a ter).

Aos técnicos Lizandra e Israel pelos encaixes de horários no escâner de lâminas.

Ao Centro de microscopia óptica pelo uso do Escâner de Lâminas.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR pelo uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão.

A CAPES pela bolsa de Mestrado.

A Universidade Federal do Paraná pelo ensino.

RESUMO

Nas últimas décadas o crescimento industrial vem gerando uma maior demanda na produção de novos polímeros. A grande maioria desses compostos possui origem petrogênica e são inflamáveis. Para atender a demanda de prevenção de incêndio prevista nas normas internacionais de segurança, os retardantes de chamas têm sido desenvolvidos para reduzir a possibilidade de combustão destes materiais. Dos 209 congêneres disponíveis em Éteres Difenilpolibromados, o Decabromodifenil Éter (BDE-209) foi o único que não foi banido da maioria dos países onde é produzido. Este composto é encontrado em diversos ambientes, inclusive os aquáticos em grandes concentrações associados à biota, podendo, portanto, devido às suas propriedades lipofílicas ser bioacumulado no tecido adiposo de vertebrados. O Tribromofenol (TBF) é um metabólito gerado a partir dos Éteres Difenilpolibromados que também é utilizado como pesticida e retardantes de chama em madeira, no entanto, seus efeitos tóxicos são pouco conhecidos. Tendo em vista esse panorama, o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade do BDE-209 e TBF em *Oreochromis niloticus* com o uso de biomarcadores (histopatológicos e bioquímicos) após exposição oral. Foram montados três experimentos: (i) piloto, no qual foi testada duas doses de 5ng.g⁻¹ administradas via oral a cada 5 dias, durante dez dias de experimento; (ii) agudo, no qual foram testadas doses de 0,5, 5 e 50 ng.g⁻¹ com coletas a partir de 24, 48, 72 e 96 horas de exposição; (iii) subcrônica, onde foram utilizadas as mesmas doses do experimento agudo onde estas foram administradas com intervalo de 10 dias totalizando 10 doses. Foram utilizados quinze indivíduos por grupo experimental. Após a exposição os animais foram mortos pós-anestesia e coletadas amostras de fígado (histopatologia e bioquímica) e músculo, e o cérebro (neurotoxicidade). Os resultados não detectaram diferença significativa nos índices morfométricos em todos os experimentos. Nas análises bioquímicas, não foi observado alterações bioquímicas entre os grupos do experimento piloto, enquanto que no experimento agudo foi verificado diferenças na atividade da GST e danos a macromoléculas, assim como no experimento subcrônico. Nas análises histopatológicas, foi observado diferença no índice de lesão apenas no experimento agudo. Apesar disso, algumas lesões no fígado em todos os experimentos foram descritas bem como danos ultraestruturais em hepatócitos em indivíduos do experimento subcrônico. O BDE mostrou-se neurotóxico na análise da atividade da acetilcolinesterase em ambos, experimento agudo e subcrônico. Os resultados indicam ainda alteração do sistema antioxidante nos ensaios agudos e subcrônica de ambos os compostos testados, sendo mais acentuada uma ativação do mecanismo no ensaio subcrônica Estes dados dão suporte aos resultados das análises histopatológicas e ultraestruturais, uma vez que foram descritos danos tanto pela microscopia de luz como eletrônica de transmissão. A perturbação observada na atividade da enzima acetilcolinesterase não é suficiente para uma avaliação neurotóxica definitiva, mais estudos são necessários. Esse trabalho utilizou um desenho experimental ainda inédito com peixes e os resultados acrescentam dados à literatura quanto aos efeitos relacionado com a exposição, e indicam fortemente a necessidade de rever as políticas de uso dos retardantes de chamas como os testados neste trabalho.

Palavras chave: Decabromodifenil Éter; Tribromofenol; *Oreochromis niloticus*; biomarcadores, efeito agudo, efeito subcrônica; exposição trófica.

ABSTRACT

In last decades, the industrial growth has generated an increased demand in the production of new polymers. Most of these compounds have petrogenic origin and are flammable. To attend the demand for fire prevention provided for in international safety standards the flame-retardants have been developed to reduce the possibility of combustion these materials. Of the 209 congeners available Ethers Difenilpolibrominated the Decabromodiphenyl ether (BDE-209) was the only one who has not been banned in most countries where it is produced. This compound is found in many environments including water in large concentrations associated with the biota, and may be, due to their lipophilic properties, bioaccumulation be in adipose tissue in vertebrates. The tribromophenol (TBF) is a metabolite generated from ethers diphenylpolibrominated that is also used as a pesticide and flame-retardants for wood, however, their toxic effects are not fully understood. Due this situation, the aim this study is to evaluate the toxicity of BDE-209 and TBF animal species of fish *Oreochromis niloticus* through biomarkers (histopathological and biochemical) after oral exposure. Three experiments were set up, in which a pilot was tested two doses of 5 ng / g administered every 5 days, ten days of experiment. An acute at doses of 0.5, 5 and 50 ng / g with sampling every 24, 48, 72 and 96 hours. And finally a sub-chronic, using doses of 0.5, 5 and 50 ng / g every 10 days for 10 contaminations. Animals were sacrificed after anesthesia and liver collected (histopathology and biochemical), brain and muscle (cholinesterase). No significant differences were detected in the morphometric indices in all experiments. In the biochemical analysis was not observed biochemical changes in the pilot experiment, however, it was observed differences in GST activity in the acute experiment and damage to macromolecules, as well as sub-chronic experiment. In the histopathological analysis, a difference in injury rates only in the acute experiment was observed. Nevertheless, lesions were observed in liver in all experiments, and ultrastructural liver damage listed in the sub-chronic experiment. In the analysis of acetylcholinesterase activity, there was a statistical difference for the BDE in acute and sub-chronic experiment. As the results can be seen a difference in the antioxidant system behavior in acute and sub-chronic tests. In experiment sub-chronic note a marked oxidative stress in both pollutants, confirming that the histopathologic analysis, one time were found damage seen in both light microscopy, as in transmission. In the nervous system, have a disturbance in the enzyme acetylcholinesterase activity, but more parameters need to be evaluated to confirm a possible neurotoxicity. This study has unprecedented experimental design and shows the need to review the use of flame-retardants policies, adding the data in the literature about damage that these products can cause.

Key words: Decabromodiphenyl ether; Tribromophenol; *Oreochromis niloticus*: biomarkers, acute effects; sub-chronic effects, trophic exposure.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ETAPAS DO PROCESSO DE QUEIMA.....	18
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLIBROMADOS. (A) TETRABROMOBISFENOL - A. (B) HEXABROMOCICLODECANO. (C) ÉTER DIFENILPOLIBROMADO (BDE-209).....	20
FIGURA 3 CICLO DE PRODUÇÃO E DEGRADAÇÃO DOS PBDE'S.....	22
FIGURA 4 - EXEMPLO DA ESPÉCIE OREOCHROMIS NILOTICUS, CONHECIDO POPULARMENTE COMO TILÁPIA.	27
FIGURA 6. ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO EM ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO PILOTO.....	38
FIGURA 7. ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO EM ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO.....	40
FIGURA 8. ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO EM ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO SUBCRÔNICO. * INDICANDO DIFERENÇA ESTATÍSTICA EM RELAÇÃO AO CONTROLE. $P>0,05$	42
FIGURA 9. AVALIAÇÃO DE RESPOSTA DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO PILOTO. (A) PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA. (B) CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS. (C) CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS. (D) ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE.....	42
FIGURA 10. AVALIAÇÃO DE RESPOSTA DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE) UTILIZADOS NO ESTUDO PILOTO. (A) PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA; BARRA VERMELHA INDICA $F= 2,6$ E $P=0,03$. (B) CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS; BARRA VERMELHA INDICA $F= 2,4$ E $P=0,03$. (C) CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS. (D) ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE EM O. NILOTICUS UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO. AS LETRAS INDICAM DIFERENÇA NOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO. * E # INDICAM DIFERENÇAS ENTRE AS DOSES. A BARRA VERMELHA REPRESENTA DIFERENÇA NA INTERAÇÃO DOSE E TEMPO. $P>0,05$	43
FIGURA 11. AVALIAÇÃO DE RESPOSTA DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO SUBCRÔNICO. (A) PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA. (B) CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS. (C) CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS. (D) ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE. * REPRESENTA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA EM RELAÇÃO AO CONTROLE. $P>0,05$	44
FIGURA 12. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), PROVENIENTES DO ESTUDO PILOTO. (A) TECIDO COM ASPECTO NORMAL, PROVINDO DO GRUPO CONTROLE; TECIDO HEPÁTICO (SETA PRETA); TECIDO PANCREÁTICO (SETA VERMELHA). (B) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO EXPOSTO A TBF. (C) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO TECIDO PANCREÁTICO EXPOSTO A BDE. (D) COLESTASE NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A TBF; (SETAS PRETAS) (E) ESTEATOSE (SETAS	

PRETAS) NO TECIDO HEPÁTICO EXPOSTO A TBF. (F) GRANULOMATOSE PERITUBULAR (SETA PRETA) EXPOSTO A TBF. (G) GRANULOMATOSE PERIVASCULAR (SETA PRETA) EXPOSTO A BDE. (H) DEPÓSITOS HIALÍNICOS (SETA PRETA) DE O. NILOTICUS EXPOSTO A BDE. COLORAÇÃO: HEMATOXILINA E EOSINA..... 46

FIGURA 13. ÍNDICE DE LESÃO SEGUNDO BERNET ET AL. (1999) EM FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), PROVENIENTES DE EXPERIMENTO PILOTO. 47

FIGURA 14. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), PROVENIENTES DO ESTUDO AGUDO. A) TECIDO COM ASPECTO NORMAL EM INDIVÍDUOS EXPOSTO A BDE 5 EM 48 HRS; TECIDO HEPÁTICO (SETA PRETA); TECIDO PANCREÁTICO (SETA VERMELHA). (B) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A TBF 0,5 EM 24 HRS. (C) COLESTASE (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO EXPOSTO A TBF 5 EM 24 HRS. (D) ESTEATOSE (SETAS PRETAS) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A TBF 0,5 EM 48 HRS. (E) GRANULOMATOSE PERIVASCULAR (SETAS PRETAS), EXPOSTO A BDE 5 EM 72 HRS. (F) GRANULOMATOSE PERITUBULAR (SETA PRETA), EXPOSTO A BDE 50 EM 72 HRS. (G) DEPÓSITO HIALÍNICO (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A BDE 50 EM 24HRS. (H) NÚCLEOS PLEOMÓRFICOS NO TECIDO HEPÁTICO (SETA PRETA), EXPOSTO A TBF 50 EM 48 HRS. (I) CONGESTÃO VASCULAR NO TECIDO HEPÁTICO (SETA PRETA), EXPOSTO A BDE 0,5 EM 96 HRS. (H) HEMORRAGIA (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A TBF 5 EM 72 HRS. COLORAÇÃO: HEMATOXILINA E..... 49

FIGURA 15. ÍNDICE DE LESÃO SEGUNDO BERNET ET AL. (1999) EM FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO ESTUDO AGUDO. LETRAS MOSTRAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE OS TEMPOS DE CADA DOSE. * E # MOSTRAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE AS DOSES. P>0,05..... 50

FIGURA 16. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), PROVENIENTES DO ESTUDO SUBCRÔNICO. (A) TECIDO COM ASPECTO NORMALEM INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE; TECIDO HEPÁTICO (SETA PRETA); TECIDO PANCREÁTICO (SETA VERMELHA). (B) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A TBF 50. (C) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO TECIDO PANCREÁTICO EXPOSTO A BDE 50. (D) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO VASO SANGUÍNEO EXPOSTO A BDE 0,5. (E) COLESTASE (SETA PRETA) NP TECIDO HEPÁTICO EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A TBF50. (F) ESTEATOSE (SETAS PRETAS) NO TECIDO HEPÁTICO, EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A BDE 5. (G) GRANULOMATOSE PERIVASCULAR (SETAS PRETAS) EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO BDE 50. (H) GRANULOMATOSE PERITUBULAR (SETA PRETA) EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A BDE 50. (I) RESPOSTA INFLAMATÓRIA (SETA PRETA) EM INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE. (J) DEPÓSITOS HIALÍNICOS (SETA PRETA) EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO TBF 50. COLORAÇÃO: HEMATOXILINA E EOSINA..... 51

FIGURA 17. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), PROVENIENTES DO ESTUDO SUBCRÔNICO. (K) CONGESTÃO VASCULAR (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A BDE 0,5. (L) HEMORRAGIA (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTOS A BDE 50. (M)

ÁREA DE DIFERENCIAÇÃO TECIDUAL (CÍRCULO VERMELHO) DO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTOS A BDE 5. (N) NEOPLASIA (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO EXPOSTOS AO BDE 50. (O) NEOPLASIA (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO EXPOSTOS A BDE 50.....	52
FIGURA 18. ÍNDICE DE LESÃO SEGUNDO BERNET ET AL. (1999) EM FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO ESTUDO SUBCRÔNICO.....	52
FIGURA 19. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS DO GRUPO CONTROLE. NÚCLEO (N); MEMBRANA PLASMÁTICA (SETA BRANCA). CANALÍCULO BILIAR (SETA VERDE). RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (SETA AZUL). MITOCÔNDRIAS (SETA LARANJA). SINUSÓIDE (SETA VERMELHA). ESPAÇO DE DISSE (SETA AMARELA). GRÂNULO DE COLESTASE (SETA PRETA).	54
FIGURA 20. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS PROVENIENTES DO GRUPO TBF 0,5. NÚCLEO (N); NÚCLEO ALTERADO (NA); RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (SETA AZUL); SINUSÓIDE (SETA VERMELHA); ESPAÇO DE DISSE (SETA AMARELA); GRÂNULOS DE COLESTASE (SETA PRETA).	56
FIGURA 21. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE O. NILOTICUS PROVENIENTES DO GRUPO TBF 5. NÚCLEO (N); RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (SETA AZUL). MITOCÔNDRIAS (SETA LARANJA). GRÂNULOS DE COLESTASE (SETA PRETA). ESPAÇOS CITOPLASMÁTICOS COM ASPECTO DIFUSO (SETA VERMELHA); NUCLEÓLO ALTERADO (SETA BRANCA).....	57
FIGURA 22. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS PROVENIENTES DO GRUPO TBF 50. NÚCLEO (N). NÚCLEO ALTERADO (NA). RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (SETA AZUL). GRÂNULOS DE COLESTASE (SETA PRETA). ACÚMULO LIPÍDICO (SETA LARANJA). DEPÓSITO HIALÍNICO (SETA VERMELHA). CÉLULA EM PROCESSO DE MORTE POR NECROSE (SETA AMARELA). CANALÍCULO BILIAR (SETA VERDE).	58
FIGURA 23. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS PROVENIENTES DO GRUPO BDE 0,5. NÚCLEO ALTERADO (NA). MEMBRANA PLASMÁTICA (SETA BRANCA). MITOCÔNDRIA (SETA LARANJA). GRÂNULOS DE COLESTASE (SETA PRETA). ACÚMULO LIPÍDICO (SETA ROXA); CÉLULA EM PROCESSO DE MORTE POR NECROSE (SETA AZUL); CANALÍCULO BILIAR (SETA VERDE). SINUSÓIDE (SETA VERMELHA); ESPAÇO DE DISSE (SETA AMARELA).	59
FIGURA 24. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS PROVENIENTES DO GRUPO BDE 5. NÚCLEO (N). SINUSÓIDE (SN). CÉLULA EM PROCESSO DE MORTE POR NECROSE (SETA AZUL); MELANOMACRÓFAGO (CÍRCULO VERMELHO); ESPAÇO DE DISSE (SETA AMARELA); ENDOTÉLIO (SETA VERMELHA).	60
FIGURA 25. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS PROVENIENTES DO GRUPO BDE 50. NÚCLEO (N). NÚCLEO ALTERADO (NA). ERITRÓCITO (SETA VERDE); RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (SETA AZUL); MITOCÔNDRIAS (SETA LARANJA); GRÂNULOS DE COLESTASE (SETA PRETA). CÉLULA EM PROCESSO DE MORTE POR NECROSE. (SETA BEGE); HEMORRAGIA (SETA VERMELHA); ESPAÇO DE DISSE (SETA AMARELA); ACÚMULO DE SUBSTÂNCIA DESCONHECIDA (SETA ROSA); PROCESSO INICIAL DE NECROSE (SETA ROXA).	61
FIGURA 26. COMPARAÇÃO ENTRE O ÍNDICE DE LESÃO NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, APÓS EXPOSIÇÃO AO TRIBROMOFENOL (TBF) E	

DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), COMPARANDO O GRUPO 96 HORAS DO EXPERIMENTO AGUDO COM O EXPERIMENTO SUBCRÔNICO.....	62
FIGURA 27. ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS APÓS EXPOSIÇÃO AO TRIBROMOFENOL (TBF) E DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADO NO ESTUDO PILOTO. (A) MÚSCULO. (B) CÉREBRO.	63
FIGURA 28. ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS APÓS EXPOSIÇÃO AO TRIBROMOFENOL (TBF) E DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADO NO ESTUDO AGUDO. (A) MÚSCULO; BARRA VERMELHA INDICA $F=2,8$ E $P=0,02$. (B) CÉREBRO. AS LETRAS INDICAM DIFERENÇA NOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO. * E # INDICAM DIFERENÇAS ENTRE AS DOSES. A BARRA VERMELHA REPRESENTA DIFERENÇA NA INTERAÇÃO DOSE E TEMPO. $P>0,05$	63
FIGURA 29. ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS APÓS EXPOSIÇÃO AO TRIBROMOFENOL (TBF) E DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADO NO ESTUDO SUBCRÔNICO. (A) MÚSCULO (B) CÉREBRO. * INDICAM DIFERENÇA EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE. $P>0,05$	64
FIGURA 30. HIPÓTESE 1 PARA EXPLICAR A QUEDA NA ATIVIDADE DE GST NO EXPERIMENTO AGUDO DE AMBOS OS CONTAMINANTES.	67
FIGURA 31. HIPÓTESE 2 PARA EXPLICAR A QUEDA NA ATIVIDADE DE GST NO EXPERIMENTO AGUDO DE AMBOS OS CONTAMINANTES.	68

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - CONCENTRAÇÕES MÉDIAS ENCONTRADOS DE PBDE'S EM DIFERENTES AMBIENTES. FONTE: ADAPTADO DE EZECHIÁŠ ET AL. (2014).....	23
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS NOS GRUPOS CORRESPONDENTES DO EXPERIMENTO AGUDO.....	30
TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS NOS GRUPOS CORRESPONDENTES DO EXPERIMENTO SUBCRÔNICA.	30
TABELA 4 - ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E SEUS RESPECTIVOS FATORES DE IMPORTÂNCIA, PROPOSTO POR BERNET. AL. (1999).	32
TABELA 5 - PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO PILOTO....	38
TABELA 6 - PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO TEMPO 24 HORAS, UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO.	39
TABELA 7 - PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO TEMPO 48 HORAS, UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO.	39
TABELA 8 - PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO TEMPO 72 HORAS, UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO.	39
TABELA 9 - PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE) NO TEMPO 96 HORAS, UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO.	40
TABELA 10 - NÚMERO DE ANIMAIS UTILIZADOS DA ESPÉCIE O. NILOTICUS, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO EXPERIMENTO SUBCRÔNICO. ..	41

TABELA 11 - PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE <i>O. NILOTICUS</i> , EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO SUBCRÔNICO.....	41
TABELA 12 - INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NOS INDIVÍDUOS NO EXPERIMENTO PILOTO.....	45
TABELA 13 - INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE <i>O. NILOTICUS</i> , EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), DO ESTUDO AGUDO EM 24 HORAS.	47
TABELA 14 - INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE <i>O. NILOTICUS</i> , EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), DO ESTUDO AGUDO EM 48 HORAS.	47
TABELA 15 - INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE <i>O. NILOTICUS</i> , EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), DO ESTUDO AGUDO EM 72 HORAS.	48
TABELA 16 - INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE <i>O. NILOTICUS</i> , EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), DO ESTUDO AGUDO EM 96 HORAS.	48
TABELA 17 - INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE <i>O. NILOTICUS</i> , EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), DO ESTUDO SUBCRÔNICO.	50

LISTA DE ABREVIACÕES

BDE-209	-	Decabromodifenil �ter
BRC	-	Bromados retardantes de chama
CAS	-	<i>Chemical Abstract Service</i>
CAT	-	Catalase
EPA	-	Enviromental Protection Agency
EROs	-	Espécies Reativas de oxigênio
GPx	-	Glutaionaperoxidase
GR	-	Glutationaredut�se
GSH	-	Gluationa reduzida
GST	-	Glutationa S-transferase
HBCD	-	Hexabromociclododecano
LPO	-	Lipoperoxidação
NBRC	-	Novos bromados retardantes de chama
PBDE	-	Polibromadosdifenil �ter
PCO	-	Carbonilação de proteínas
POPs	-	Poluentes organopersistentes
ROOH	-	Grupamentos hidroperóxidos
SOD	-	Superóxido dismutase
TBBPA	-	Tetrabromobisfenol-A

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 RETARDANTES DE CHAMAS	17
1.2 BROMADOS RETARDANTES DE CHAMAS	19
1.3 ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS	21
1.4 TRIBROMOFENOL	24
1.5 BIOINDICADORES E MODELOS DE ESTUDO	26
1.6 BIOMARCADORES	27
1.7 OBJETIVOS	28
1.7.1 Objetivo geral	28
1.7.2 Objetivos específicos	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1 Desenho experimental	29
2.1.1 Preparo dos contaminantes	29
2.1.2 Ensaio piloto	29
2.1.3 Ensaio agudo	30
2.1.4 Ensaio subcrônico	30
2.2 Coleta do material biológico	31
2.3 Histopatologia	31
2.4 Ultraestrutura do fígado	32
2.5 Preparo do fígado para análise bioquímica	33
2.6 Análise de Estresse Oxidativo	34
2.6.1 Concentração total de proteínas	34
2.6.2 Peroxidação lipídica	34
2.6.3 Carbonilação de proteínas	35
2.6.4 Tióis não proteicos	35
2.6.5 Glutathione S- transferase	36
2.7 Neurotoxicidade	36
2.7.1 Preparo das amostras de cérebro e músculo	36
2.7.2 Acetilcolinesterase	36
3. RESULTADOS	37
3.1 Índices Morfométricos	37
3.2 Estresse Oxidativo	41
3.3 Histopatologia	44
4.4 NEUROTOXICIDADE	62
4. DISCUSSÃO	64

5. CONCLUSÕES.....	74
6. REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico proporcionou ao ser humano conforto e comodidade por todas as partes do mundo, e para atender essa demanda em expansão, a indústria química tem aumentado exponencialmente a produção de novos compostos. Uma rápida pesquisa no *Chemical Abstract Services* mostra que, 108,2 milhões de substâncias orgânicas e inorgânicas foram registradas até fevereiro de 2016. Em maio de 2013 este número estava em 71 milhões de substâncias, sendo um aumento de 34% em apenas trinta e três meses. Dentre todas essas substâncias, estima-se que 15% estão disponíveis comercialmente, 0,13% são usadas cotidianamente, mas apenas 0,003% possuem efeito tóxico comprovado (CAS, acesso em 2016).

De todos os segmentos da indústria química no planeta, a indústria petroquímica vem dominando boa parte deste mercado mundial com início principalmente no século XX. Este tipo de atividade utiliza a nafta (derivado do petróleo, obtido através do refino) ou gás natural, como matéria-prima básica. A partir de processos sofisticados as moléculas originais dos hidrocarbonetos, existentes no petróleo ou gás, são quebradas, recombinações ou modificadas, dando origem a uma série de produtos, que, por sua vez, serão “a base química” de outras indústrias como: calçadista, de tecidos, plásticos, pneus, tintas, alimentos, embalagens etc. (D’ÁVILA, 2002). Devido à alta inflamabilidade desses compostos, e visando atender às demandas de segurança, uma nova classe de substâncias surgiu, denominados retardantes de chamas.

1.1 RETARDANTES DE CHAMAS

O crescimento da indústria de bens de consumo pressupõe historicamente também um maior desenvolvimento da indústria química. Como grande parte destes produtos são altamente inflamáveis, foi necessário criar normas que atendessem aos critérios de segurança contra a inflamabilidade na prevenção de incêndios, surgindo assim um novo segmento da indústria com a produção de moléculas “retardantes de chama”(ALAE et al., 2003).

A combustão de materiais envolve três principais componentes: uma fonte de combustível, energia necessária para criar combustão e gás comburente (ex. Oxigênio). A combustão ocorre principalmente em cinco etapas: a) aquecimento; b) pirólise; c) ignição; d) combustão e propagação; e) extinção (Figura 1).

FIGURA 1 - ETAPAS DO PROCESSO DE QUEIMA



FONTE: Gallo e Agnelli (1998).

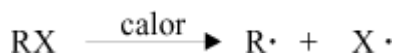
Na etapa da pirólise, há liberação de substâncias específicas, dependendo do material em que está ocorrendo a combustão, como gases combustíveis e não combustíveis, partículas sólidas como a fuligem e radicais livres. Devido a presença de impurezas incorporadas no processamento de polímeros, de oxigênio e outras impurezas oxidantes, há a formação de grupamentos hidroperóxidos (ROOH), gerando assim espécies reativas ($O\cdot$ e $HO\cdot$), na pirólise. Esse processo irá ter consequências em outras etapas da combustão (GALLO e AGNELLI, 1998).

Na medida em que a pirolise ocorre, radicais livres se estendem ao longo do material polimérico e juntamente com a fonte de calor e oxigênio disponível dão origem à ignição. A propagação do fogo é causada pela retroalimentação do sistema, uma vez que o calor e a decomposição do material levam à produção de radicais livres gerados pela pirólise. No momento em que o material é reduzido se dá início ao processo de extinção (GALLO e AGNELLI, 1998).

Os retardantes de chama podem atuar em qualquer uma dessas fases, dependendo de suas propriedades químicas (ALAE et al., 2003). Um grupo de retardantes de chamas em destaque hoje são os halogenados. Os halogênios pertencem a família 7A da tabela periódica e são caracterizados por possuírem

elétrons na sua camada de valência, tornando-os extremamente eletronegativos ($I > Br > Cl > F$). Assim, o papel destes compostos é neutralizar os radicais de alta energia $HO\cdot$ e $H\cdot$ formados nas etapas iniciais da combustão através do seguinte mecanismo:

- Inicialmente ocorre a dissociação do agente halogenado:



- O radical halogenado reage então com uma ligação C-H, para formar o ácido halogenídrico correspondente:



- O ácido formado reage com os radicais de alta energia, estabilizando-os e interrompendo o mecanismo que sustenta o processo de combustão:



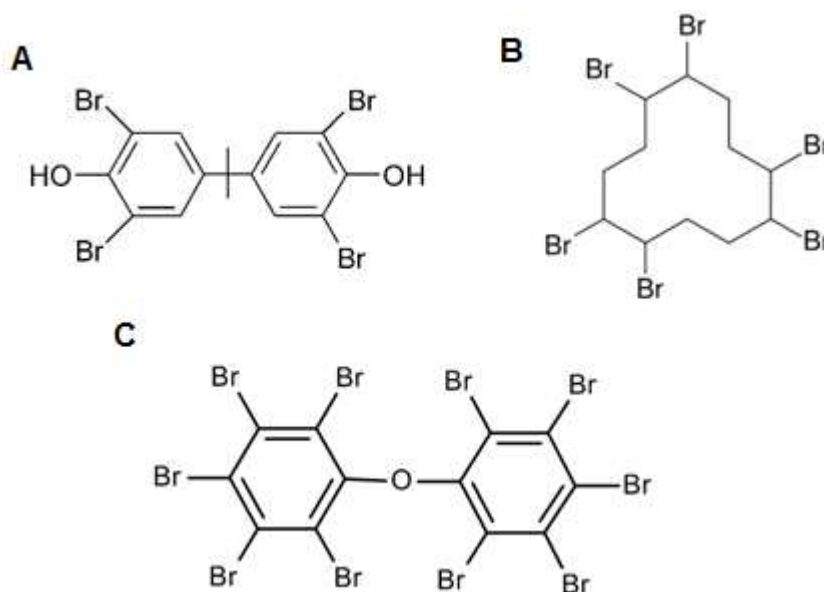
- Os radicais de alta energia $H\cdot$ e $HO\cdot$ são, portanto, substituídos pelos radicais halogenídricos de baixa energia $X\cdot$, incapazes de manter as reações de combustão. Sendo assim, o verdadeiro efeito retardante de chama é exercido pelo ácido Halogenídrico (GALLO e AGNELLI, 1998).

Porém, nem todos os compostos halogenados podem ser utilizados como retardantes de chamas, uma vez que alguns se decompõem a altas temperaturas, como é o caso dos fluorados e iodatos. Neste caso, os bromados constituem o principal grupo utilizado na produção destes compostos (ALAE et al., 2003; COVACI et al., 2011; TROITZCH, 1990).

1.2 BROMADOS RETARDANTES DE CHAMAS

Até o presente momento, diversos bromados utilizados como retardantes de chamas (BRC) foram produzidos e esse número continua em ascensão. Podemos dividir os bromados em três grupos ditos “convencionais”: Tetrabromobisfenol A (TBBPA), Hexabromociclododecano (HBCD) e os Éteres difenil-polibromados (PBDE) (Figura 2) (KOPP et al., 2012).

FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLIBROMADOS. (A) TETRABROMOBISFENOL - A. (B) HEXABROMOCICLODECANO. (C) ÉTER DIFENILPOLIBROMADO (BDE-209).



FONTE: O Autor (2016).

A maioria dos estudos ambientais tem se concentrado em éteres difenilpolibromados (PBDEs), Tetrabromobisfenol A (TBBP-A) e hexabromociclododecano (HBCD). Os compostos PBDEs são muitas vezes aplicados na produção de resinas termoendurecíveis, poliésteres, espuma de poliuretano e têxteis. O teor de PBDEs em alguns tipos de espuma de poliuretano chega a ter de 10 a 30% do peso total. O TBBP-A é utilizado na produção de resinas epóxi e de policarbonato, para ser aplicado na fabricação de placas de circuito impresso. Seu teor de bromo pode atingir cerca de 10% do peso total do equipamento; enquanto que os HBCD, com um teor de bromo de 74,7%, são aplicados principalmente em espuma de poliestireno ou usados em vários outros

produtos, incluindo mobiliário, têxteis e materiais de construção (ZHANG et al., 2016).

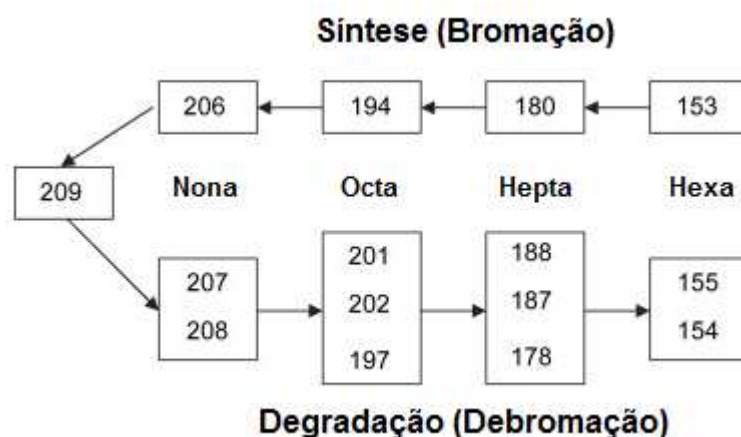
Com o avanço tecnológico e a produção em massa de resíduos eletrônicos (*e-waste*), a dispersão de componentes associados ao lixo nos ambientes naturais tem aumentado. A grande preocupação tem foco nos países em desenvolvimento, uma vez que a alternativa na eliminação acaba em incineração. Tue e colaboradores (2016) mostraram um alto grau de liberação de componentes bromados e clorados em locais de queima de equipamentos eletrônicos em Gana. O trabalho mostra que, comparados a outros produtos, o grau de dispersão é baixo, ficando retido mais ao solo, demonstrando que alguns extratos do ambiente são mais propícios a reter estes compostos. Dentre os retardantes de chamas citados, o foco dos estudos de toxicidade tem se voltado para a classe dos PBDEs.

1.3 ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS

Dentre as três classes mais comuns, o PBDE é o composto mais comercializado hoje. São amplamente utilizados em produtos eletrônicos, na indústria têxtil, materiais de construção e plásticos. Sua molécula possui um núcleo éter difenil com 10 átomos de hidrogênio, onde é possível substituí-los por átomos de bromo. Isso cria a possibilidade de formar pelo menos 209 congêneres que são produzidos em escala industrial em três graus de bromação: pentabromofenil, octobromofenil e decabromofenil (ZHANG et al., 2014b). Sua produção é realizada a partir de um éter difenil, onde é adicionado um solvente, como o dibromometano, juntamente com um catalisador de cloreto de alumínio (AlCl_3) (ALAE et al., 2003).

A bromação, na síntese de PBDE's, é conduzida pela adição subsequente de bromo em posições específicas, formando assim diferentes outros congêneres até a formação do Decabromodifenil Éter (BDE-209). Devido a condições ambientais como ausência de oxigênio (anaeróbia) e a incidência de luz, a debromação é possível de acontecer espontaneamente em congêneres mais inferiores (Figura 3) (VETTER et al., 2008).

FIGURA 3 CICLO DE PRODUÇÃO E DEGRADAÇÃO DOS PBDE'S.



FONTE: Adaptado de VETTER et al., 2008.

Os éteres difenilpolibromados são persistentes na natureza e biomagnificado na cadeia trófica. Devido a esta propriedade da molécula, a Convenção de Estocolmo, um tratado para controlar e eliminar gradualmente os principais poluentes orgânicos persistentes (POPs) do planeta, recentemente incluiu os PBDE's em sua lista de restrição (ZHANG et al., 2014).

A produção de penta e octobromofenil foi banida em países da União Europeia, Estados Unidos e Canadá, porém, continuam sendo usados sob restrições em países emergentes como China e Índia. Quanto ao decabromofenil, este é liberado na maioria desses países, havendo restrições em apenas alguns deles (SHI et al., 2013). Nesse mesmo estudo, Shi e colaboradores (2013), demonstraram grandes concentrações destes três congêneres na maioria dos produtos eletrônicos e em artefatos de culinária e cozinha como panelas (que pode chegar 5g de BDE por quilo de material) e filtros de água (atingindo 90g de BDE por quilo de material). Pelo fato de não haver restrições, o Deca-BDE (BDE-209) é o mais utilizado desses produtos, correspondendo de 70 a 90% dos polibromados encontrados no solo e na água na China (WU et al., 2007). Segundo a EPA (*Environmental Protection Agency* dos Estados Unidos) o lançamento total de BDE-209 na superfície terrestre e na atmosfera entre 1988 e 2004 foi estimado em 500 toneladas métricas por ano, sendo que cerca de 90 toneladas foram despejadas em estações de tratamento de esgoto (LA GUARDIA; HALE; HARVEY, 2007).

Alguns estudos têm demonstrado a presença de PBDE's em diferentes matrizes ambientais, resumidos na Tabela 1.

TABELA 1 - CONCENTRAÇÕES MÉDIAS ENCONTRADOS DE PBDE'S EM DIFERENTES AMBIENTES.

MATRIZ	QUANTIDADE	PAÍS
Ar atmosférico	402-3578 pg / m ³	China
	Média de 1,2-5,2 pg / m ³	EUA
Ar interior	ND - 3400 ng / g	Reino Unido
	ND - 121 ng / g	Suécia
	10-11,070 ng / g	EUA
Poeira doméstica	ND - 121 ng / g	Suécia
	10-11,070 ng / g	Reino Unido
	20-2467 ng / g	EUA
Água	ND médio - 5,1 ng / L	Noruega
Sedimento	4,8-24 ng / g	Espanha
	38,8-364 ng / g	China
Peixe	ND - 2,71 ng / g de lípidos	Canadá
	ND - 338 ng / g de lípidos	China

FONTE: Adaptado de EZECHIÁŠ *et al.* (2014).

Ward *et al.* (2008) relatam a bioacumulação do BDE-209 em tecidos de animais capturados nos Grandes Lagos da América do Norte, da mesma forma que relatam a presença destes compostos em grande quantidade no sedimento. A origem destes poluentes, segundo os autores, é atribuída à presença de indústrias químicas produtoras de polibromados na região, bem como indústrias eletrônica e de reciclagem.

O mecanismo neurotóxico pelo qual agem os PBDE's ainda não está bem elucidado, porém, sabe-se que possui um papel relevante na desregulação de hormônios tireoidianos, interferindo indiretamente com o sistema nervoso (COSTA *et al.*, 2013). Segundo Song e colaboradores (2014), os efeitos neurotóxicos do BDE-209 podem estar relacionados com a baixa expressão de enzimas relacionadas à replicação e transcrição, além de proteínas do citoesqueleto. Estes dados foram obtidos com estudos recentes de proteômica realizados com células tronco cerebrais.

O fígado é outro órgão alvo importante na ação tóxica dos polibromados (FENG *et al.*, 2012a). De acordo com Munschy e colaboradores (2011), as concentrações de 14 congêneres de PBDE's expressos em relação ao teor de lipídios, variaram de 0,01 ng.g⁻¹ de peso seco para 0,16 ng.g⁻¹ de peso seco no

músculo, e de 0,07 ng.g⁻¹ de peso seco a 2,8 ng.g⁻¹ de peso seco no fígado, mostrando que o acúmulo nesse órgão pode estar relacionado com os efeitos na função do mesmo. Nesta mesma linha, estudos tem mostrado que os BDE-209 podem sofrer biotransformação, como debromação e hidroxilação, no fígado através do complexo Citocromo P450, (TOMY et al., 2004).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido considerada como um possível mecanismo de toxicidade para os organismos aquáticos quando expostos a contaminantes via hídrica. Sob condições normais, espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros agentes pró-oxidantes são continuamente neutralizados em células através de mecanismos de defesa antioxidantes, nos quais são incluídas as enzimas antioxidantes (I) superóxido dismutase (SOD), (II) catalase (CAT), (III) glutathionaredutase (GR), (IV) glutathiona peroxidase (GPx), (V) glutathiona S -transferase (GST), e sequestradores de ROS de baixo peso molecular tal como a glutathiona reduzida (GSH) (FENG, et al. 2013). Os polibromados podem em maior tempo de exposição inibir a atividade da catalase e superóxido dismutase, mostrando que esse composto pode potencialmente alterar o equilíbrio oxido redutor em células do fígado (FENG et. al., 2013). No entanto, estudos que demonstram o modo de ação ou mesmo os mecanismos de ação em células ou tecidos em resposta à presença do BDE-209 e demais congêneres ainda são limitados.

1.4 TRIBROMOFENOL

Devido a restrições impostas pelas agências de regulação ambiental da União Europeia, Estados Unidos da América e China, muitos desses bromados foram substituídos por uma outra classe ascendente, denominada como novos bromados retardantes de chamas (NBRC). No entanto, são produtos que também não possuem estudos conclusivos quanto ao potencial tóxico, e por isso seu uso é mais tolerado (EZECHIAŠ et al., 2014).

Dentre os NBRCs, o Tribromofenol (TBF) é uma substância particular. Este produto é também usado como pesticida, possui atividade fungicida e atualmente é um substituto do pentaclorofenol como conservante de madeira. Além disso, o TBF é também utilizado como um antisséptico e germicida e vem sendo cada vez mais utilizado como retardante de chama em poliéster

termoplástico e resinas como a epóxi, acrilonitrila-butadieno-estireno e fenólicas, ou mesmo em poliestirenos. As aplicações são amplas em dispositivos eletrônicos e eletrotécnicos, como telefones celulares, televisores, computadores, dentre outros (RÍOS et al., 2003). O tribromofenol pode ser produzido via adição de bromo em um anel benzênico, porém, também pode ser encontrado como metabólito de diversos congêneres de BDEs (DONG et al., 2010; SHI et al., 2013).

Estudos sugerem que o TBP perturba a regulação hormonal. Olsen e colaboradores (2002) descrevem uma fraca ligação desta substância com o receptor de estrogênio (ER), demonstrado através de um ensaio de troca usando 17 β -estradiol. Neste experimento, apenas 43% de troca foi obtida com as maiores concentrações testadas. Hamers e colaboradores (2006) descreveram um efeito antagonista em ER com CL₅₀ = 8,3 uM e uma pequena inibição da sulfatação de estradiol (HAMERS et al., 2006). O mesmo estudo também descreve a capacidade de TBP substituir a tiroxina (T4) de sua proteína de transporte, a transtirretina (TTR); a capacidade de ligação do TBP no receptor da tiroide foi 10 vezes maior do que a T4 isolada.

Há pouca informação sobre a toxicidade TBP tanto para a biota como para a população humana, no entanto, de acordo com Deng et al. (2010), alguns resultados sugerem que o TBP pode ser a causa de neurotoxicidade, embriotoxicidade e teratogênese em ratos (DENG et al., 2010).

A justificativa deste trabalho, portanto, concentra-se no fato de que comprovadamente os retardantes de chamas constituem uma classe de poluentes que ganharam destaque nas últimas décadas, face ao seu uso intenso e sua importância para a indústria em geral. Dos 25 compostos indicados pela EPA (Environmental Protection Agency - USA) como substâncias a serem investigadas no ambiente, mais de 50% são retardantes de chamas. A parcela de estudos envolvendo as diversas classes de bromados para este fim vem crescendo, porém, ainda há poucos dados quanto ao potencial tóxico destas substâncias e os riscos de exposição para a biota e para as populações humanas. Uma preocupação recente vem do fato de que representantes desta classe de poluentes já são encontrados no leite materno, o que mostra uma exposição efetiva para populações humanas, sendo por isso classificado como um potente poluente emergente. Em virtude disso, faz-se necessário intensificar os estudos com estes compostos, possibilitando agregar informações à literatura e

possibilitando maiores discussões em torno deste tema, contribuindo assim com futuras intervenções políticas quanto à regulamentação da produção e emissão desses compostos.

Frente a isso, o presente estudo teve como premissa a exposição aguda e subcrônica ao decabromodifenil éter e ao tribromofenol em indivíduos da espécie *Oreochromis niloticus*. A partir de então, foram avaliadas alterações no equilíbrio óxido redutor em células do fígado, alterações histológicas no mesmo órgão e ultraestruturais em hepatócitos além de avaliações de neurotoxicidade.

1.5 BIOINDICADORES E MODELOS DE ESTUDO

Dentre todos os ambientes naturais os aquáticos acabam sofrendo o maior impacto com a liberação de produtos químicos produzidos pelo homem. Muitos destes compostos são lançados diretamente em corpos d'água, expondo organismos aquáticos podendo atingir toda a cadeia alimentar.

Um bioindicador é definido como um organismo que reflete informações sobre as condições ambientais no seu habitat, por meio do seu comportamento tanto no aspecto individual como de população. Portanto, segundo Van der Oost e colaboradores (2003), estes organismos são considerados indicadores ecológicos de parâmetros que avaliam a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas.

A espécie *Oreochromis niloticus*, popularmente conhecida como Tilápia do Nilo (figura 4) é natural da bacia do rio Nilo e tem sido introduzida em diferentes regiões do planeta visto que possui uma alta exploração comercial (FISHBASE, acesso em 2016). Sua capacidade de adaptação é grande e, portanto, é uma espécie resistente a diversidades ambientais e muito estudada, o que lhe garante um vasto banco de dados genético.

FIGURA 4 - EXEMPLO DA ESPÉCIE OREOCHROMIS NILOTICUS, CONHECIDO POPULARMENTE COMO TILÁPIA.



FONTE: FISHBASE, acesso em 2016.

1.6 BIOMARCADORES

Os dados referentes à localização no ambiente e de biodisponibilidade e bioacumulação dos polibromados são suficientes para mostrar que é uma classe de agentes químicos onipresente expondo tanto a biota como populações humanas. No entanto, devido ao uso intenso e recente ainda há uma escassez de dados no que se refere aos efeitos biológicos destes compostos (COSTA et al., 2014; EZECHIÁŠ et al 2014).

Os biomarcadores podem ser classificados como: a) *biomarcadores de exposição*, quando é medida a presença de uma substância exógena ou seus metabólitos em um organismo; b) *biomarcadores de efeito*, quando são quantificadas alterações bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais nos indivíduos expostos; e c) *biomarcadores de suscetibilidade*, quando é medida uma habilidade inerente ou adquirida de um organismo em responder durante a exposição a um determinado xenobiótico (WHO, 1993; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os estudos que envolvem o uso de biomarcadores de exposição são importantes para elucidar os possíveis efeitos que determinados xenobióticos causam antes que estes sejam visíveis, como a mortalidade e alterações nos padrões populacionais. Assim, os biomarcadores indicam, desde os níveis mais simples de organização biológica até os mais complexos, se a presença de determinado xenobiótico interfere com a saúde do indivíduo, ou dependendo da magnitude da resposta interfere com a população, comunidades de organismos e consequentemente com o ecossistema (PEAKALL, 1994; BODIN et al., 2004).

AHMAD e colaboradores (2000) afirmam que, parâmetros de estresse oxidativo e bioquímicos, assim como a histopatologia, são biomarcadores de grande utilidade na aquicultura e nas avaliações de risco ambiental, e a combinação de parâmetros, como estresse oxidativo e histopatologia são interessantes biomarcadores de efeito (KELLY & JANZ, 2009).

Visando a grande importância que os PBDE's e o TBF possuem na indústria, faz-se necessário adicionar mais dados à literatura, uma vez que poucos trabalhos investigaram seus efeitos nos organismos. Para isso, a hipótese desse trabalho é que a exposição subcrônica e aguda ao decabromodifenil éter e ao tribromofenol em indivíduos da espécie *Oreochromis niloticus*, compromete a homeostase do organismo, modificando seus parâmetros bioquímicos e histológicos.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo geral

Avaliar o modo de ação tóxica do Decabromodifenil Éter (BDE-209) e do Tribromofenol (TBF) em Tilápia (*Oreochromis niloticus*) utilizando biomarcadores de exposição e efeito, após a exposição aguda e subcrônica.

1.7.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade através do estado óxido redutor em hepatócitos bem como danos a macromoléculas (lipídeos e proteínas);
- Avaliar os efeitos histopatológicos em fígado e ultraestruturais em hepatócitos.
- Avaliar os efeitos neurotóxicos através da atividade da colinesterase em músculo e cérebro;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho experimental

2.1.1 Preparo dos contaminantes

O decabromodifenil éter e o tribromofenol foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®. As soluções mãe foram preparadas com concentração de 10 ng/uL em óleo de canola (Sigma®) para obter diluições de 0,1 e 1 ng/uL. A administração foi calculada a partir do peso dos animais, onde 5uL de volume era administrado a cada grama de peso, chegando às concentrações estipuladas nesse trabalho (0,5, 5 e 50 ng.g⁻¹). As diluições foram preparadas a partir da solução mãe para cada experimento.

Todos os desenhos experimentais foram aprovados pela comissão de ética para o uso de animais do setor de ciências biológicas registrado através do processo número 23075.098048/2011-32.

2.1.2 Ensaio piloto

Foi realizado um experimento piloto no Instituto de Pesquisa e Produção em Aquicultura Avançada (InPAA) da Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE), no município de Toledo – PR. Neste experimento, trinta animais machos da espécie *Oreochromis niloticus*, com uma média de peso de 276,4±35,1 g foram divididos em três grupos contendo cada 10 animais: Controle negativo (somente óleo), Experimental I (5ng.g⁻¹ de BDE-209) e Experimental II (0,5 ng.g⁻¹ de TBF). Foram realizadas duas administrações com intervalos de cinco dias, sendo que os animais foram levados ao óbito cinco dias após receber a última dose. O procedimento de exposição foi realizado através de gavagem, onde os poluentes citados foram injetados por uma cânula até o estômago utilizando o óleo de canola (Sigma®) como veículo. O mesmo volume do veículo sem os contaminantes foi injetado no grupo controle negativo. A quantidade administrada foi calculada conforme o peso dos indivíduos no momento da aplicação após anestesia com 0,02% de MS222 (Sigma®).

2.1.3 Ensaio agudo

O experimento agudo foi realizado na piscicultura Panamá, localizada no município de Paulo Lopes – SC. Cento e sessenta e oito animais machos da espécie *Oreochromis niloticus*, com uma média de peso de $73,3 \pm 5,8$ g foram utilizados para o experimento. Os animais foram divididos em seis grupos contendo cada 28 animais: BDE – 209 a $0,5 \text{ ng.g}^{-1}$, 5 ng.g^{-1} , 50 ng.g^{-1} e TBF a $0,5 \text{ ng.g}^{-1}$, 5 ng.g^{-1} , 50 ng.g^{-1} . A exposição foi realizada no dia 0 e 7 animais de cada grupo foram coletados com intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas (Tabela 2). O procedimento de exposição foi o mesmo descrito para o experimento piloto.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* NOS GRUPOS CORRESPONDENTES DO EXPERIMENTO AGUDO.

	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
TBF	7 indivíduos $0,5$; 5 e 50 ng.g^{-1}	7 indivíduos $0,5$; 5 e 50 ng.g^{-1}	7 indivíduos $0,5$; 5 e 50 ng.g^{-1}	7 indivíduos $0,5$; 5 e 50 ng.g^{-1}
BDE - 209	7 indivíduos $0,5$; 5 e 50 ng.g^{-1}	7 indivíduos $0,5$; 5 e 50 ng.g^{-1}	7 indivíduos $0,5$; 5 e 50 ng.g^{-1}	7 indivíduos $0,5$; 5 e 50 ng.g^{-1}

FONTE: O autor

2.1.4 Ensaio subcrônico

O experimento subcrônico foi realizado também na piscicultura Panamá, localizada no município de Paulo Lopes – SC, onde cento e cinco animais machos da espécie *Oreochromis niloticus*, com uma média de peso de $137,2 \pm 31,8$ g foram utilizados para o experimento. Os indivíduos foram divididos em sete grupos, cada um com 15 animais: Controle, BDE – 209 a $0,5 \text{ ng.g}^{-1}$, 5 ng.g^{-1} , 50 ng.g^{-1} e TBF a $0,5 \text{ ng.g}^{-1}$, 5 ng.g^{-1} , 50 ng.g^{-1} (Tabela 3). Foram realizadas oito administrações com intervalos de dez dias, sendo que os animais foram levados ao óbito dez dias após receber a última dose. O procedimento de exposição foi o mesmo descrito para o experimento piloto e para a exposição aguda.

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* NOS GRUPOS CORRESPONDENTES DO EXPERIMENTO SUBCRÔNICA.

Controle	15 Indivíduos		
TBF	15 Indivíduos $0,5 \text{ ng.g}^{-1}$	15 Indivíduos 5 ng.g^{-1}	15 Indivíduos 50 ng.g^{-1}
BDE - 209	15 Indivíduos $0,5 \text{ ng.g}^{-1}$	15 Indivíduos 5 ng.g^{-1}	15 indivíduos 50 ng.g^{-1}

FONTE: O autor

2.2 Coleta do material biológico

Após anestesia com 0,02% de MS222 foi realizada a biometria (medidas de comprimento total e padrão, e pesagem do corpo). Os animais foram mortos através de secção medular. O fígado foi pesado e imediatamente uma porção foi fixada em solução de ALFAC (85% de Álcool 80%, 10% de Formol e 5% de ácido acético) por 16 h para microscopia de luz, outro fragmento foi fixado em solução de Karnovsky (Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 4%, CaCl_2 0.05M diluídos em tampão Cacodilato 0.1M e pH 7,2-7,4) por duas horas em temperatura ambiente para estudos ultraestruturais. O restante do órgão foi acondicionado em nitrogênio líquido e mantido em freezer a -80°C para análises bioquímicas. Amostras do músculo e o cérebro foram também preservadas por congelamento em nitrogênio líquido e acondicionados em freezer -80°C para estudos de neurotoxicidade.

2.3 Histopatologia

Após 16 h em fixador ALFAC (85% de álcool 80%, 10% de formol e 5% de ácido acético glacial) o fígado foi lavado com etanol 70%. Posteriormente o material foi desidratado em série crescente de etanol, diafanizado em xilol, incluído e emblocados em paraplast Sigma® no Processador de Tecidos Micron® e Dispensador de Parafina Micron®, respectivamente. Utilizando o micrótomo (Leica®), cortes de $5\mu\text{m}$ foram obtidos e corados com Hematoxilina e Eosina para análise em microscopia de luz transmitida.

Para quantificação dos danos foi utilizado o método descrito por Bernet et. al. (1999). Os danos foram considerados de acordo com seu fator de importância, onde: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível; (2) importância moderada, reversível em muitos casos e (3) importância marcante, geralmente irreversível, levando a diminuição das funções do órgão (Tabela 4). De acordo com o grau de ocorrência, foram atribuídos valores, que vão de 0 (inalterado) a 6 (ocorrência severa). O Índice de lesão (IL) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IL = \sum_{pr} \sum_{alt}(a \times w)$$

Onde: pr = padrão de reação, alt = alteração, a = valor atribuído à alteração e w = fator de importância.

TABELA 4 - ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E SEUS RESPECTIVOS FATORES DE IMPORTÂNCIA, PROPOSTO POR BERNET. AL. (1999).

Padrão de Reação	Alteração	Fator de importância
Distúrbios circulatórios	Hemorragia	W = 1
	Congestão vascular	W = 1
Mudanças regressivas		
• Morte Celular	Necrose	W = 3
• Alterações nucleares	Núcleos pleomórficos	W = 2
• Depósitos	Colestase	W = 2
	Esteatose	W = 1
Alterações estruturais	Diferenciação tecidual	W = 1
Inflamação	Infiltração leucocitária	W = 2
	Granulomatose perivascular	W = 2
	Granulomatose tubular	W = 2
Neoplasia	Tumor benigno	W = 2
	Tumor maligno	W = 3

FONTE: O autor

Para registro das imagens, algumas lâminas após análise em microscópio de luz foram selecionadas para que fossem escaneadas no equipamento Axio Imager 2 Research Microscope (Zeiss®) do Centro de Microscopia de Luz do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

2.4 Ultraestrutura do fígado

As amostras de fígado, do experimento sub crônico, coletada para estudos ultraestruturais foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1mm² e fixados em Karnovsky modificado por 2 horas em temperatura ambiente (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4%, CaCl₂ 0,05 M em cacodilato 0,1 M, pH 7,2 - 7,4). Após o período de fixação os fragmentos foram lavados com tampão cacodilato 0,1 M. A pós-fixação foi em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora. Posteriormente os fragmentos foram lavados em cacodilato 0,1 M e desidratados em série alcoólica crescente (Merck®) e em óxido de propileno (Electron Microscopy Science®). A inclusão foi em resina PolyEMBED812 (Electron Microscopy Science®). Após polimerização, os blocos

foram trimados e realizados os cortes semifinos para a escolha da área do tecido a ser estudada.

Os cortes semifinos foram cortados em 500nm de espessura, corados em Azul de Toluidina 1% borificado 1%. Após selecionar a região a ser estudada, foram obtidos cortes ultrafinos com navalha de diamante (Drukker®) com espessura de 70nm, pescados em telas de cobre com 200mesh. Os cortes foram obtidos em ultramicrotomo automático Leica®.

Após o procedimento de corte, as telas passaram por processo de contrastação. Primeiramente a solução de Reynolds (citrato de chumbo) foi colocada para centrifugar por 20 minutos. Em seguida passou-se à contrastação com acetato de uranila. Uma placa de petri coberta com papel alumínio foi forrada internamente com papel filtro e *Parafilm*®. O contato com a luz favorece a precipitação da uranila sobre os cortes. Gotas de Uranila foram colocadas ao sobre o *Parafilm*® e as telinhas com os cortes voltados para baixo foram colocados em cima das gotas por 20 minutos. Após a contrastação, as telinhas foram lavadas mergulhando 10 vezes em três recipientes contendo água destilada e secadas em papel filtro.

Para a contrastação com Reynolds (nitrato de chumbo), na mesma placa de petri forrada com *Parafilm*® foram colocados cristais de NaOH para sequestrar o CO₂, evitando assim que o chumbo precipite sobre o corte. Gotas de Reynolds foram colocadas sobre o *Parafilm*®. As telinhas com os cortes voltados para baixo foram colocadas sobre as gotas por 5 minutos. Após a contrastação, as telinhas foram lavadas como procedimento descrito para uranila.

2.5 Preparo do fígado para análise bioquímica

Para análise de estresse oxidativo, o fragmento do fígado foi homogeneizado em Tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6, PMSF 1 mM, centrifugados a 12000 RCF e em seguida o sobrenadante foi alicotado da seguinte forma: 50 µl para concentração total de proteínas, 200 µl para peroxidação lipídica, 100 µl para carbonilação de proteínas, 200 µl para concentração de glutathiona reduzida e 100 µl para atividade da enzima glutathiona S-transferase. As alíquotas foram armazenadas em freezer -80 até o momento das análises.

2.6 Análise de Estresse Oxidativo

2.6.1 Concentração total de proteínas

A fim de normalizar os cálculos, a concentração total de proteínas no sobrenadante foi determinada a partir do método de Bradford (1976), comparando com uma curva-padrão de albumina de soro bovino (BSA). Em uma microplaca, foi adicionado 10 µl do sobrenadante das amostras seguidos de 250 µl do reativo de Bradford (Coomassie brilliant blue BG-250). As leituras foram em absorbância com comprimento de onda de 595 nm. Como branco foi utilizado o tampão Tris-HCl. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância com aqueles provenientes de curva-padrão de BSA (albumina de soro bovina) nas concentrações de 0, 125, 250, 500, 750 e 1000 µg de BSA por mililitro de volume final de solução. A curva-padrão incluía pelo menos quatro réplicas por concentração de BSA e esteve presente em todos os ensaios de quantificação de proteínas.

2.6.2 Peroxidação lipídica

Danos aos lipídios com formação de hidroperóxidos lipídicos foram detectados pelo método FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method) baseado em Jiang e colaboradores (1991, 1992). Este método baseia-se na rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} mais laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado.

Foram adicionados 500 µl de meio de reação [(laranja de xilenol a 100 µM, H_2SO_4 a 25 mM, BHT (hidroxitolueno butilado) a 4 mM, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{NH}_4$ (sulfato ferroso amoniacal) a 250 µM (acrescentados na sequência descrita em metanol PA)] em 200 µl do sobrenadante (Tampão Tris-HCl para o branco). Após incubação durante 20 min, as amostras foram centrifugadas novamente a 10.000 g durante 5 min a 4 °C. Em seguida, foi adicionado 250 µl do sobrenadante a uma microplaca, procedendo-se a medida de absorbância a 570 nm de comprimento de onda.

2.6.3 Carbonilação de proteínas

A carbonilação de proteínas consiste na modificação das cadeias laterais de aminoácidos com a formação de grupamentos do tipo aldeídos, cetonas, amidas, carboxilas e ésteres. Estes danos na estrutura proteica (especificamente a formação de grupamentos aldeídicos e cetônicos) foram avaliados de acordo com Levine et al. (1994). Para esse ensaio, foram normalizadas as concentrações de proteínas à 1 mg/ml, a fim de evitar erros na leitura devido à alta concentração.

Um volume de 500 µl de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (10 mM DNPH em 2 M de HCl) foram adicionados aos tubos contendo 200 µl do sobrenadante das amostras ou de HCl (2 M, sem DNPH) em tubos separados para o branco. O conteúdo foi agitado em vortex por 5 min e mantidas a 37 °C por 90 min. As proteínas foram precipitadas pela adição de 700 µl de ácido tricloroacético a 28 % e centrifugadas a 9.000 g por 10 min. Os *pellets* de proteínas foram lavados duas vezes pela suspensão em etanol/acetato de etila (1:1), misturados em vortex e centrifugados novamente. As proteínas foram então solubilizadas em 6 M de cloreto de guanidina e centrifugadas em 9.000 g por 5 min para remover traços de material insolúvel. A presença de carbonilas foi medida espectrofotometricamente a 360 nm e a concentração de carbonilas determinadas usando o coeficiente de absorção molar de $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para hidrazonas e normalizada pelo conteúdo total de proteínas.

2.6.4 Tióis não proteicos

Para determinar o conteúdo de tióis não proteicos, foi utilizado o método de Sedlak e Lindsay (1968), onde o principal tiol não proteico da célula é a Glutathiona reduzida. 200 µl do sobrenadante alicotado recebeu 50 µl de ácido tricloroacético a 50% para a precipitação de proteínas. Após uma nova centrifugação 50 µl do conteúdo dos tubos foram colocados em duplicata em microplacas de 96 poços. Para a curva de calibração foi preparada uma solução de Glutathiona reduzida nas concentrações de 160, 80, 40, 20, 10, 5 e 0 µM. 50 µl do conteúdo de cada ponto da curva foram colocados em quadruplicada na microplaca. Para o branco 50 µl de tampão Tris-HCl foram colocados na placa em duplicata. Todos os poços receberam 230 µl do tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9 e logo em seguida foi

adicionado 20 μ l DTNB (2,5 mM de 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) em metanol 25%). Após 5 min, a absorbância foi medida a 415 nm.

2.6.5 Glutathione S-transferase

A atividade geral das Glutathione S-transferases (GST) foi monitorada através do aumento de absorbância resultante da formação de um tioéter pelos substratos GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), método esse descrito por Keen e colaboradores (1976). Para esse ensaio, foram normalizadas as concentrações de proteínas à 1 mg/ml, a fim de evitar erros na leitura devido à alta concentração. O volume de 20 μ l do sobrenadante da amostra foi adicionado a microplaca (Tampão Tris-HCl para o branco) e, imediatamente antes das leituras de absorbância, 180 μ l do meio de reação (GSH a 1,5 mM, CDBN a 2,0 mM, tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 6,5) foi rapidamente acrescentado. O aumento gradual na absorbância foi registrado em intervalos de 12 s durante 2 min a 340 nm para posterior seleção do primeiro intervalo de 1 min com $r^2 \geq 0,99$ para o cálculo do delta da absorbância por minuto. A atividade da enzima foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $9.6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

2.7 Neurotoxicidade

2.7.1 Preparo das amostras de cérebro e músculo

Para análise de neurotoxicidade, o cérebro e o músculo foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio a 0,1 M, centrifugadas a 12000 RCF e em seguida alicotados a 50 μ l para concentração total de proteínas e 200 μ l para análise da acetilcolinesterase.

2.7.2 Acetilcolinesterase

A atividade da enzima acetilcolinesterase foi mensurada em homogenato de cérebro e músculo, pelo método de Ellman e colaboradores (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). A atividade geral das Acetilcolinesterase foi monitorada através do aumento de absorbância resultante

da formação do 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina e o 5-tio-2-nitrobenzoato formados pela reação entre a tiocolina (produto da hidrólise da acetiltiocolina pela AChE) e o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB).

Para esse ensaio, foram normalizadas as concentrações de proteínas à 1 mg/ml, a fim de evitar erros na leitura devido à alta concentração. O volume de 20 µl do sobrenadante da amostra foi adicionado a microplaca (Tampão Tris-HCl para o branco) e, imediatamente antes das leituras de absorbância, 130 µl da solução de DTNB a 0,75 mM (Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5) e rapidamente acrescentado 50 µl da solução de Iodeto de Acetilcolina a 9mM. O aumento gradual na absorbância foi registrado em intervalos de 52 s durante 4 min a 405 nm para posterior seleção do primeiro intervalo de 1 min com $r^2 \geq 0,99$ para o cálculo do delta da absorbância por minuto. A atividade da enzima foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.8 Análise

Para todos os dados foram feitas o teste de normalidade através do teste D'Agostino & Pearson. Para os ensaios piloto e subcrônica, foi utilizado ANOVA de uma via, com pós testes de Dunet. Para o ensaio agudo, foi utilizado ANOVA bi-fatorial. Para o resultado de comparação entre os índices de lesão entre o experimento agudo e subcrônico, foi realizado um teste t não paramétrico de Mann Whitney, onde foram pareadas apenas as doses correspondentes.

3. RESULTADOS

3.1 Índices Morfométricos

Para verificar se houve alteração na massa do fígado, foi realizado o índice hepatossomático, que consiste na relação da massa do fígado com a massa do corpo.

Dos quarenta peixes que iniciaram o experimento piloto, 34 sobreviveram até o final das exposições. Cinco indivíduos do Grupo BDE e um do grupo controle

não sobreviveram até o final das exposições, e não houve mortalidade no grupo TBF.

Na tabela abaixo seguem os valores médios da biometria em cada grupo no ensaio piloto.

TABELA 5. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO PILOTO.

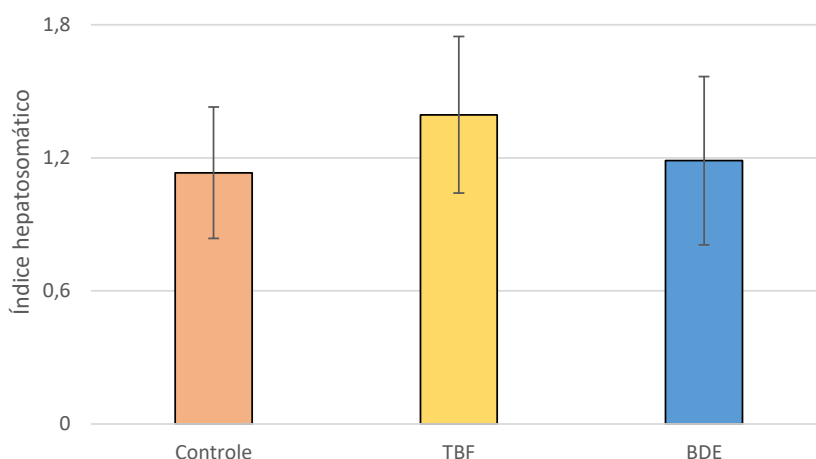
Grupos	Massa (g)	Comprimento Total (cm)	Comprimento Padrão (cm)	Peso do Fígado (g)	Mortalidade
Controle	268,9 ±124,2	24,5±4	19,7±2,9	3,2±2,3	10%
TBF	328,1±106,7	26,4±2,4	21,8±2,0	4,5±1,9	0%
BDE	254,3±148,9	23,8±5,3	19,4±4,6	2,9±2,0	50%

FONTE: O autor

O gráfico da figura 5 mostra que não houve diferença estatística em relação ao peso do fígado entre os grupos contaminados e o grupo em relação ao controle.

Dos cento e sessenta e oito exemplares iniciais expostos no experimento agudo, 164 foram utilizados até o final da coleta, uma vez que houve mortalidade (cerca de 2% dos animais) nos seguintes grupos: TBF 0,5 48 horas; BDE 50 72 horas; TBF 5 e 50 96 horas.

FIGURA 5. ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO EM ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO PILOTO.



Nas tabelas abaixo seguem os valores médios da biometria em cada grupo considerado para este estudo. Os valores da tabela correspondem a média, mais ou menos desvio padrão:

TABELA 6. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO TEMPO 24 HORAS, UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO.

Grupo	Peso (g)	Comprimento Total (cm)	Comprimento Padrão (cm)	Peso fígado (g)	Mortalidade
TBF 0,5	80,3 ± 22,6	15,3 ± 1,6	12,8 ± 1,4	1,1 ± 0,3	0%
TBF 5	75,1 ± 33,6	15,4 ± 2,5	12,6 ± 1,5	1,2 ± 0,5	0%
TBF 50	59,3 ± 26,3	15,6 ± 2,6	13,0 ± 2,6	1,6 ± 1,1	0%
BDE 0,5	80,6 ± 30,9	15,3 ± 1,3	12,8 ± 1,5	1,3 ± 0,6	0%
BDE 5	80,9 ± 28,0	15,1 ± 1,1	13,0 ± 1,3	1,3 ± 0,6	0%
BDE 50	70,8 ± 18,1	14,9 ± 1,3	12,7 ± 1,2	1,0 ± 0,4	0%

TABELA 7. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO TEMPO 48 HORAS, UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO.

Grupos	Peso (g)	Comprimento Total (cm)	Comprimento Padrão (cm)	Peso fígado (g)	Mortalidade
TBF 0,5	127,5 ± 27,9	17,2 ± 1,2	14,3 ± 1,1	2,2 ± 0,6	14%
TBF 5	83,2 ± 36,0	15,5 ± 2,2	12,9 ± 1,4	1,6 ± 0,8	0%
TBF 50	114,1 ± 56,1	16,4 ± 2,9	14,1 ± 3,0	2,3 ± 1,4	0%
BDE 0,5	81,2 ± 29,1	15,6 ± 2,1	13,0 ± 1,2	1,4 ± 0,5	0%
BDE 5	75,7 ± 21,5	15,0 ± 0,9	12,8 ± 1,1	2,9 ± 4,2	0%
BDE 50	69,4 ± 44,9	15,1 ± 2,2	12,7 ± 2,0	1,3 ± 0,7	0%

TABELA 8. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO TEMPO 72 HORAS, UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO.

Grupos	Peso (g)	Comprimento Total (cm)	Comprimento Padrão (cm)	Peso fígado (g)	Mortalidade
TBF 0,5	87,2 ± 36,5	15,8 ± 2,2	13,0 ± 1,8	1,3 ± 0,9	0%
TBF 5	73,7 ± 26,8	15,0 ± 2,3	12,7 ± 1,6	1,1 ± 0,4	0%
TBF 50	75,6 ± 14,0	15,6 ± 0,9	12,6 ± 0,8	1,1 ± 0,2	0%
BDE 0,5	60,0 ± 30,0	14,4 ± 2,1	11,9 ± 1,8	1,1 ± 0,6	0%
BDE 5	81,3 ± 27,4	15,4 ± 2,2	13,2 ± 1,6	1,3 ± 0,5	0%
BDE 50	71,9 ± 20,4	14,8 ± 1,9	12,7 ± 1,4	1,0 ±	14%

TABELA 9. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE) NO TEMPO 96 HORAS, UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO.

Grupos	Peso (g)	Comprimento Total (cm)	Comprimento Padrão (cm)	Peso fígado (g)	Mortalidade
TBF 0,5	100,3 ± 34,0	16,4 ± 1,7	13,6 ± 1,5	1,6 ± 0,7	0%
TBF 5	90,8 ± 33,3	16,2 ± 2,0	13,6 ± 1,5	1,5 ± 0,9	14%
TBF 50	91,8 ± 20,1	15,9 ± 1,3	13,5 ± 1,2	1,3 ± 0,4	0%
BDE 0,5	82,3 ± 38,3	15,8 ± 1,9	12,8 ± 1,5	1,4 ± 0,9	0%
BDE 5	54,2 ± 11,8	13,7 ± 1,2	11,4 ± 1,0	0,7 ± 0,2	0%
BDE 50	74,9 ± 21,5	15,8 ± 1,7	13,0 ± 1,3	1,0 ± 0,4	0%

O gráfico da Figura 6 mostra que não houve diferença estatística com relação ao aumento da massa do fígado entre os grupos contaminados em relação ao controle durante os tempos estudados, embora algumas variações foram mais pronunciadas após 48 hs de exposição ao TBF em todas as concentrações testadas.

Dos cento e vinte animais utilizados inicialmente no experimento subcrônico, 92 foram utilizados até o final das exposições, uma vez que houve fuga dos animais das gaiolas. Na Tabela 3 encontram-se o número de indivíduos utilizados em cada grupo, juntamente com as fugas e mortes (o número inicial do experimento foi de 15 animais por grupo). Na tabela 10 segue os valores médios das medidas em cada grupo. Na Tabela 11 seguem os valores médios dos dados biométricos de cada grupo.

FIGURA 6. ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO EM ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO.

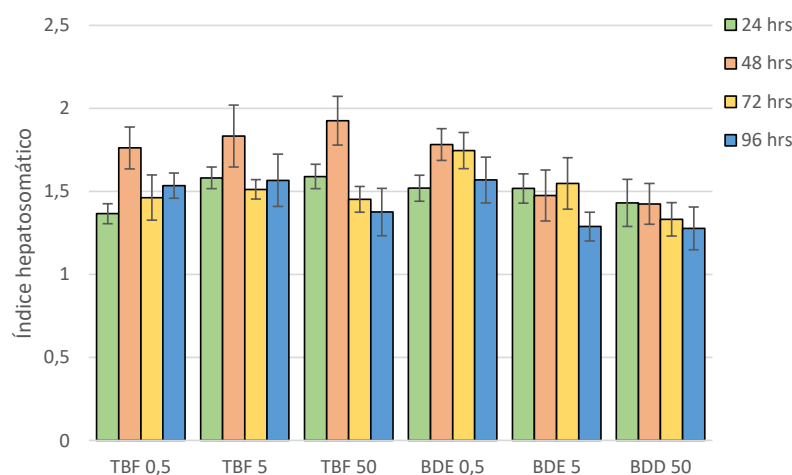


TABELA 10. NÚMERO DE ANIMAIS UTILIZADOS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO EXPERIMENTO SUBCRÔNICO.

Grupos	Fugas	Mortes	Indivíduos utilizados
Controle	0	3	12
TBF 0,5	7	3	5
TBF 5	0	2	13
TBF 50	2	3	10
BDE 0,5	0	2	13
BDE 5	1	2	12
BDE 50	0	3	12

TABELA 11. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO SUBCRÔNICO.

Grupos	Massa (g)	Comprimento Total (cm)	Comprimento Padrão (cm)	Peso do Fígado (g)
Controle	131,2 ± 36,3	17,5 ± 1,8	16,2 ± 2,5	2,5 ± 1,1
TBF 0,5	202,2 ± 46,3	20,4 ± 1,2	16,9 ± 0,9	7,7 ± 1,9
TBF 5	113,0 ± 47,1	18,1 ± 3,1	15,3 ± 2,3	1,7 ± 0,9
TBF 50	105,8 ± 33,1	17,3 ± 1,9	14,5 ± 1,5	1,6 ± 0,6
BDE 0,5	147,8 ± 34,3	19,6 ± 1,9	16,1 ± 1,4	2,3 ± 1,5
BDE 5	110,3 ± 47,9	18,1 ± 2,4	15,8 ± 2,1	1,5 ± 0,6
BDE 50	130,7 ± 38,6	19,5 ± 2	16,3 ± 1,5	1,9 ± 0,8

O gráfico da Figura 7 mostra que houve diferença estatística quanto ao peso do fígado dos indivíduos expostos dos grupos TBF 0,5 e BDE 5 quando comparados ao controle. O primeiro grupo apresentou um aumento e o segundo uma diminuição no índice.

3.2 Estresse Oxidativo

Não foi detectada diferença estatística significativa nas análises tanto para danos em macromoléculas (LPO e PCO) quanto para o sistema de defesa antioxidante (GST e Tióis não proteicos) (Figura 5) nos animais provenientes do teste piloto (duas doses a cada cinco dias e dez dias de exposição).

FIGURA 7. ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO EM ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO SUBCRÔNICO. * INDICANDO DIFERENÇA ESTATÍSTICA EM RELAÇÃO AO CONTROLE. $P > 0,05$.

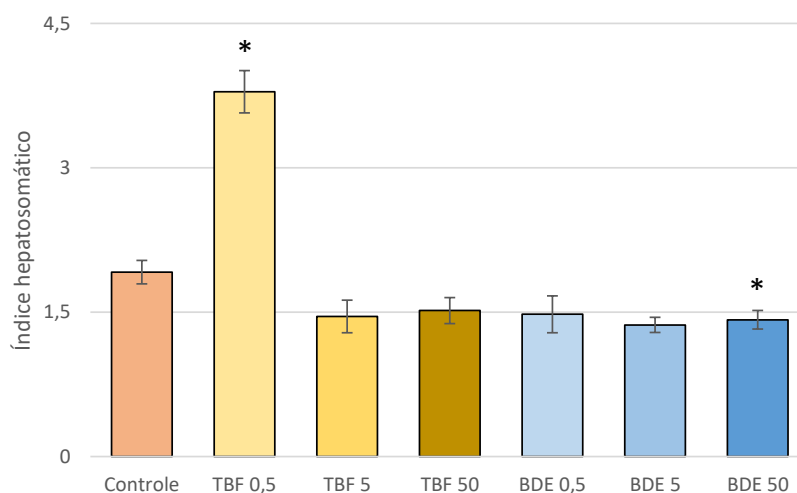
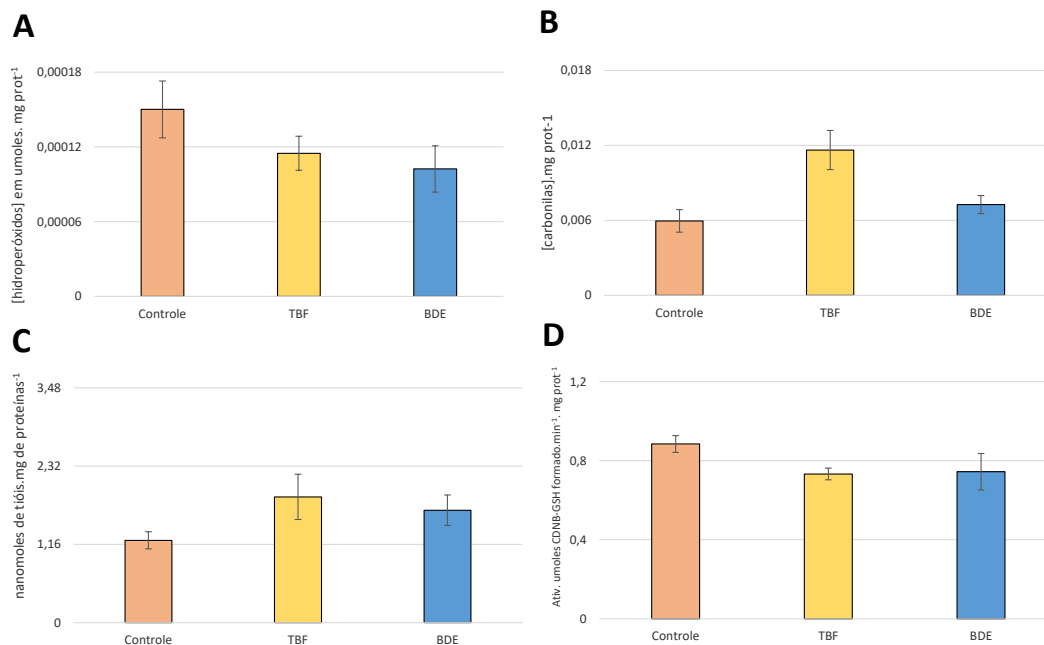


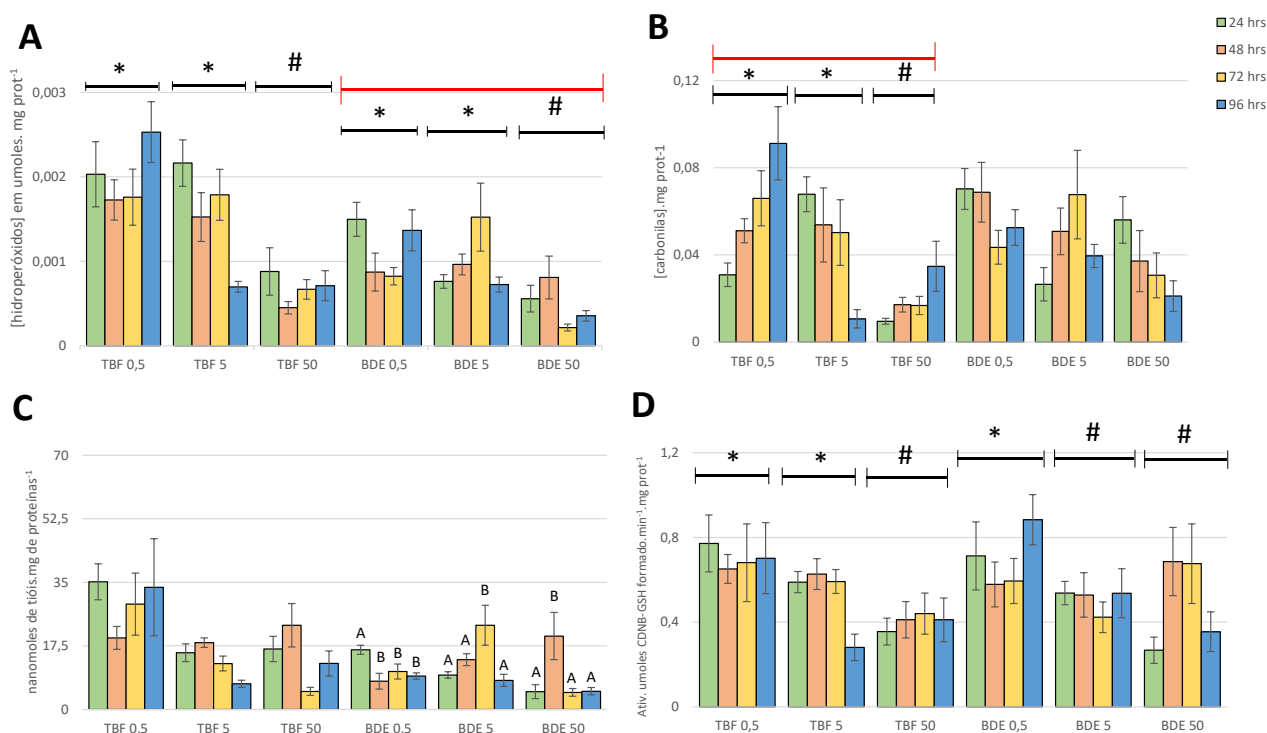
FIGURA 8. AVALIAÇÃO DE RESPOSTA DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO PILOTO. (A) PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA. (B) CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS. (C) CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS. (D) ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE.



Para o estudo agudo, foram realizados ANOVA de duas vias, considerando as variáveis dose e tempo independentes e a interação entre dose e tempo. Os resultados mostraram diferença estatística significativa nas análises

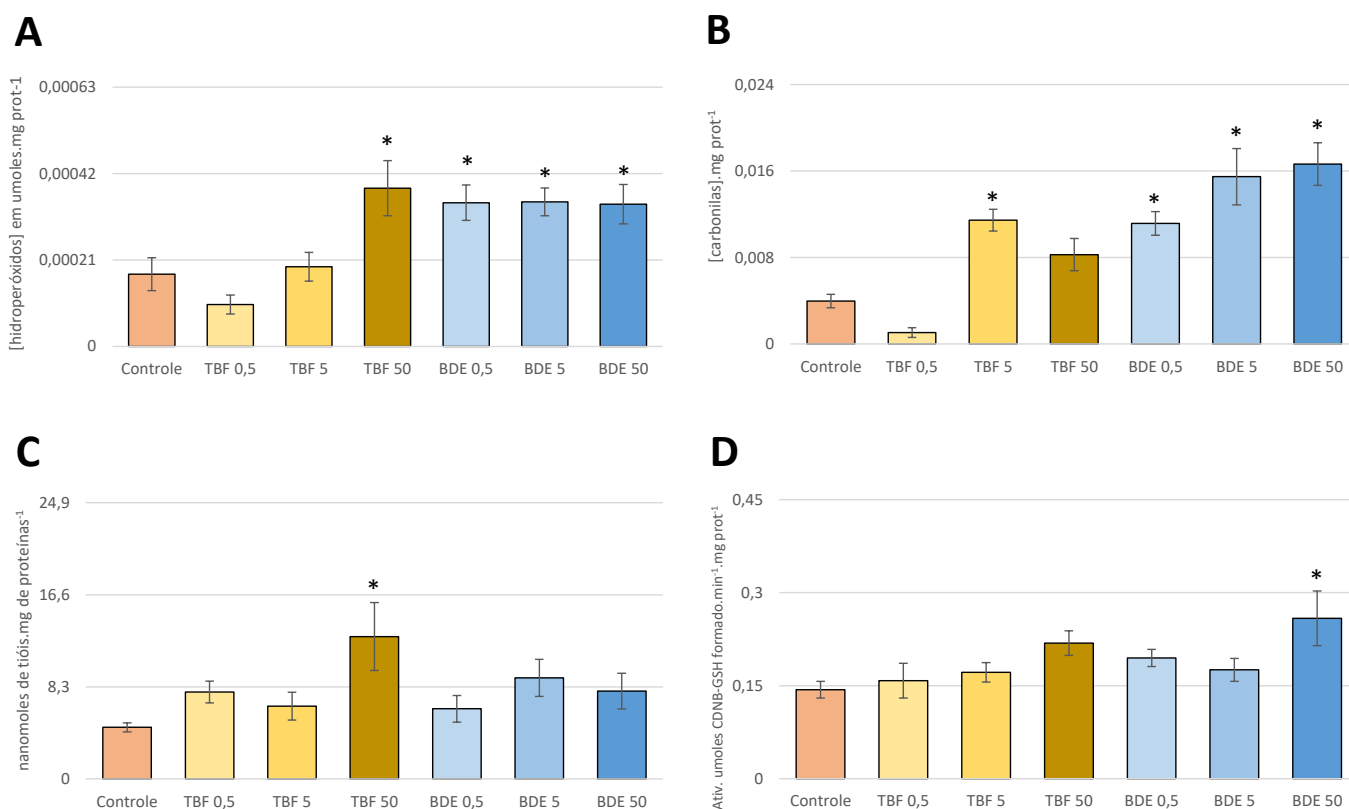
para LPO em ambos os contaminantes quando a variável é dose. No caso da exposição ao BDE a análise multivariada mostrou que além da interferência da dose na diminuição da lipoperoxidação, o tempo neste caso também contribuiu. Para a análise de PCO, houve diferença estatística somente em TBF onde foi observada uma relação dose dependente, no entanto neste caso a análise multivariada mostrou que o tempo também interfere neste resultado. Para a concentração de tióis não proteicos não houve interferência de ambos dose e tempos para nenhum dos contaminantes testados. No entanto, houve diferença significativa tempo dependente para tióis não proteicos quando os animais foram expostos ao BDE. Para GST, houve diferença para ambos os poluentes quando a variável é a dose.

FIGURA 9. AVALIAÇÃO DE RESPOSTA DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE) UTILIZADOS NO ESTUDO PILOTO. (A) PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA; BARRA VERMELHA INDICA $F=2,6$ E $P=0,03$. (B) CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS; BARRA VERMELHA INDICA $F=2,4$ E $P=0,03$. (C) CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS. (D) ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE EM *O. NILOTICUS* UTILIZADOS NO ESTUDO AGUDO. AS LETRAS INDICAM DIFERENÇA NOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO. * E # INDICAM DIFERENÇAS ENTRE AS DOSES. A BARRA VERMELHA REPRESENTA DIFERENÇA NA INTERAÇÃO DOSE E TEMPO. $P>0,05$.



No experimento subcrônico estes parâmetros mostraram-se diferentes, onde um aumento significativo na concentração de carbonilas nos grupos TBF 5, BDE 0,5, 5 e 50 foi observado (Figura 10) e na peroxidação de lipídeos nos grupos TBF 50, BDE 0,5, 5 e 50. Já o grupo TBF 50 houve um aumento da concentração de tióis não proteicos. Já a atividade da GST, houve um aumento apenas no grupo de BDE 50.

FIGURA 10. AVALIAÇÃO DE RESPOSTA DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADOS NO ESTUDO SUBCRÔNICO. (A) PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA. (B) CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS. (C) CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS. (D) ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE. * REPRESENTA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA EM RELAÇÃO AO CONTROLE. $P > 0,05$.



3.3 Histopatologia

Foram encontrados seis tipos de alterações mais evidentes no fígado dos animais provenientes do experimento piloto (tabela 12): necroses hepática (figura 11 B) e pancreática (figura 11 C), colestase (figura 11 D), esteatose (figura 11 E), granulomatose peritubular (figura 11 F) e perivascular (figura 11 G) e depósitos hialínicos (figura 11 H). A tabela 12 mostra a incidência das alterações em relação

ao número total de animais. Após aplicação do índice de Bernet, verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

TABELA 12. INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NOS INDIVÍDUOS NO EXPERIMENTO PILOTO.

	Controle	TBF	BDE
Necrose	100%	80%	100%
Colestase	100%	90%	80%
Esteatose	75%	30%	40%
Granulomatose Peritubular	7%	1%	0%
Granulomatose perivascular	0%	1%	0%
Depósitos hialínicos	14%	50%	80%

Quanto aos indivíduos provenientes do experimento agudo foram encontrados onze tipos de alterações mais evidentes no fígado dos indivíduos provenientes dos grupos estudados: necroses hepática (figura 13 B), colestase (figura 13 C), esteatose (figura 13 D) resposta inflamatória, depósitos hialínicos (figura 13 G), núcleos pleomórficos (figura 13 H) congestão vascular (figura 13 I), hemorragia (figura 13 J). Nas Tabelas de 13 a 16 mostra a incidência das alterações em relação ao número total de animais. Após aplicação do índice de Bernet, verificou-se que houve diferença estatística significativa para os grupos BDE 0,5, quando se analisa a variável dose e também quando a variável tempo é analisada para os seguintes grupos TBF 5, 50 e BDE 0,5.

Nas análises dos indivíduos provenientes do experimento subcrônico foram descritas quatorze tipos de alterações mais evidentes no fígado dos indivíduos expostos: necroses hepática (figura 15 B) e pancreática (figura 15 C), necrose de vasos (figura 15 D), colestase (figura 15 E), esteatose (figura 15 F) granulomatose perivascular (figura 15 G) e peritubular (figura 15 H), resposta inflamatória (figura 15 I), depósitos hialínicos (figura 15 J), congestão vascular (figura 15 K), hemorragia (figura 15 L) diferenciação tecidual (figura 15 M), neoplasia (figura 15 N) e tumor maligno (figura 15 O).

FIGURA 11. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), PROVENIENTES DO ESTUDO PILOTO. (A) TECIDO COM ASPECTO NORMAL, PROVINDO DO GRUPO CONTROLE; TECIDO HEPÁTICO (SETA PRETA); TECIDO PANCREÁTICO (SETA VERMELHA). (B) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO EXPOSTO A TBF. (C) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO TECIDO PANCREÁTICO EXPOSTO A BDE. (D) COLESTASE NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A TBF; (SETAS PRETAS) (E) ESTEATOSE (SETAS PRETAS) NO TECIDO HEPÁTICO EXPOSTO A TBF. (F) GRANULOMATOSE PERITUBULAR (SETA PRETA) EXPOSTO A TBF. (G) GRANULOMATOSE PERIVASCULAR (SETA PRETA) EXPOSTO A BDE. (H) DEPÓSITOS HIALÍNICOS (SETA PRETA) DE *O. NILOTICUS* EXPOSTO A BDE. COLORAÇÃO: HEMATOXILINA E EOSINA.

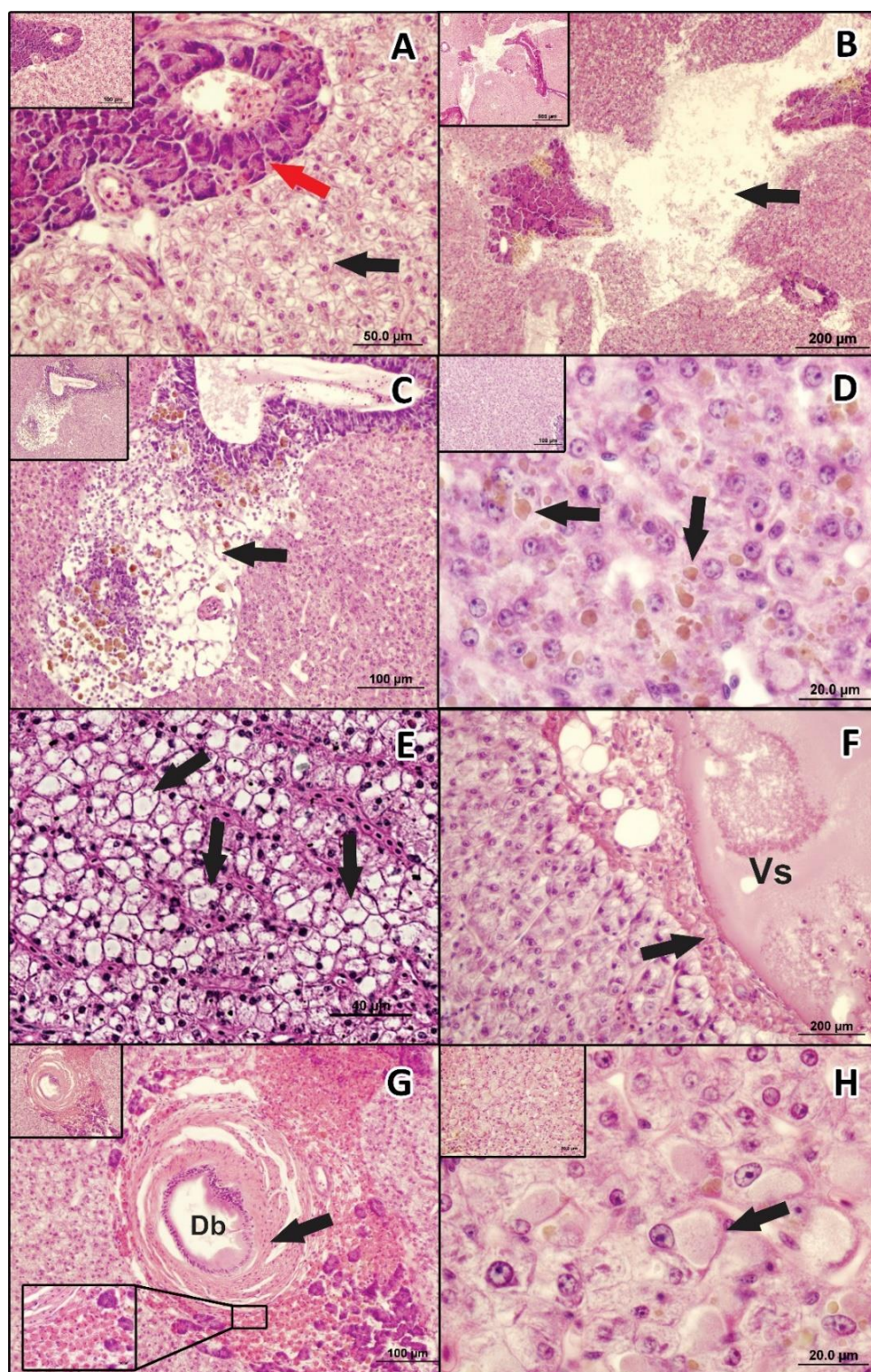
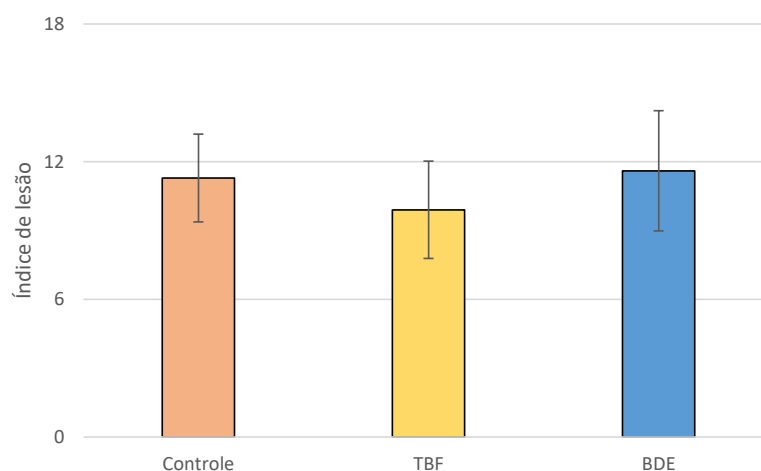


FIGURA 12. ÍNDICE DE LESÃO SEGUNDO BERNET ET AL. (1999) EM FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), PROVENIENTES DE EXPERIMENTO PILOTO.



A Tabela 13. mostra a incidência das alterações em relação ao número total de animais. Após aplicação do índice de Bernet, verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 17).

TABELA 13. INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), DO ESTUDO AGUDO EM 24 HORAS.

	TBF 0,5	TBF 5	TBF 50	BDE 0,5	BDE 5	BDE 50
Necrose	43%	100%	71%	57%	43%	43%
Colestase	14%	43%	28%	43%	14%	14%
Esteatose	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Granulomatose perivascular	43%	57%	28%	28%	57%	0%
Granulomatose peritubular	14%	0%	28%	14%	28%	14%
Resposta inflamatória	14%	0%	57%	14%	0%	57%
Depósitos hialínicos	14%	43%	43%	43%	43%	14%
Congestão vascular	28%	14%	28%	43%	43%	0%
Hemorragia	14%	0%	28%	14%	0%	14%
Núcleo pleomórficos	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Diferenciação tecidual	0%	0%	0%	0%	0%	14%

TABELA 14. INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), DO ESTUDO AGUDO EM 48 HORAS.

	TBF 0,5	TBF 5	TBF 50	BDE 0,5	BDE 5	BDE 50
Necrose	85%	71%	85%	14%	57%	57%
Colestase	14%	28%	14%	14%	14%	28%
Esteatose	0%	0%	14%	0%	0%	14%
Granulomatose perivascular	14%	43%	43%	0%	57%	14%
Granulomatose peritubular	0%	28%	0%	0%	43%	28%
Resposta inflamatória	0%	0%	14%	0%	0%	14%
Depósitos hialínicos	0%	14%	57%	0%	57%	28%
Congestão vascular	28%	57%	57%	14%	14%	14%
Hemorragia	43%	14%	14%	0%	0%	0%

Núcleo pleomórficos	0%	0%	14%	0%	0%	0%
Diferenciação tecidual	0%	0%	0%	0%	0%	0%

TABELA 15. INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), DO ESTUDO AGUDO EM 72 HORAS.

	TBF 0,5	TBF 5	TBF 50	BDE 0,5	BDE 5	BDE 50
Necrose	28%	85%	43%	43%	57%	43%
Colestase	14%	28%	14%	28%	43%	0%
Esteatose	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Granulomatose perivascular	57%	28%	28%	0%	43%	14%
Granulomatose peritubular	14%	57%	14%	0%	0%	28%
Resposta inflamatória	28%	43%	14%	0%	14%	14%
Depósitos hialínicos	57%	14%	43%	0%	43%	43%
Congestão vascular	28%	14%	43%	0%	43%	0%
Hemorragia	14%	28%	14%	14%	14%	0%
Núcleo pleomórficos	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Diferenciação tecidual	0%	0%	0%	0%	0%	0%

TABELA 16. INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), DO ESTUDO AGUDO EM 96 HORAS.

	TBF 0,5	TBF 5	TBF 50	BDE 0,5	BDE 5	BDE 50
Necrose	14%	14%	71%	43%	71%	28%
Colestase	43%	14%	14%	14%	28%	0%
Esteatose	14%	0%	14%	0%	0%	0%
Granulomatose perivascular	28%	14%	14%	0%	57%	14%
Granulomatose peritubular	14%	43%	28%	28%	14%	14%
Resposta inflamatória	43%	14%	0%	28%	28%	57%
Depósitos hialínicos	0%	28%	14%	14%	28%	14%
Congestão vascular	57%	14%	28%	28%	28%	14%
Hemorragia	28%	0%	0%	14%	14%	28%
Núcleo pleomórficos	14%	0%	14%	0%	0%	0%
Diferenciação tecidual	0%	0%	0%	0%	0%	0%

FIGURA 13. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), PROVENIENTES DO ESTUDO AGUDO. A) TECIDO COM ASPECTO NORMAL EM INDIVÍDUOS EXPOSTO A BDE 5 EM 48 HRS; TECIDO HEPÁTICO (SETA PRETA); TECIDO PANCREÁTICO (SETA VERMELHA). (B) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A TBF 0,5 EM 24 HRS. (C) COLESTASE (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO EXPOSTO A TBF 5 EM 24 HRS. (D) ESTEATOSE (SETAS PRETAS) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A TBF 0,5 EM 48 HRS. (E) GRANULOMATOSE PERIVASCULAR (SETAS PRETAS), EXPOSTO A BDE 5 EM 72 HRS. (F) GRANULOMATOSE PERITUBULAR (SETA PRETA), EXPOSTO A BDE 50 EM 72 HRS. (G) DEPÓSITO HIALÍNICO (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A BDE 50 EM 24HRS. (H) NÚCLEOS PLEOMÓRFICOS NO TECIDO HEPÁTICO (SETA PRETA), EXPOSTO A TBF 50 EM 48 HRS. (I) CONGESTÃO VASCULAR NO TECIDO HEPÁTICO (SETA PRETA), EXPOSTO A BDE 0,5 EM 96 HRS. (H) HEMORRAGIA (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A TBF 5 EM 72 HRS. COLORAÇÃO: HEMATOXILINA E EOSINA.

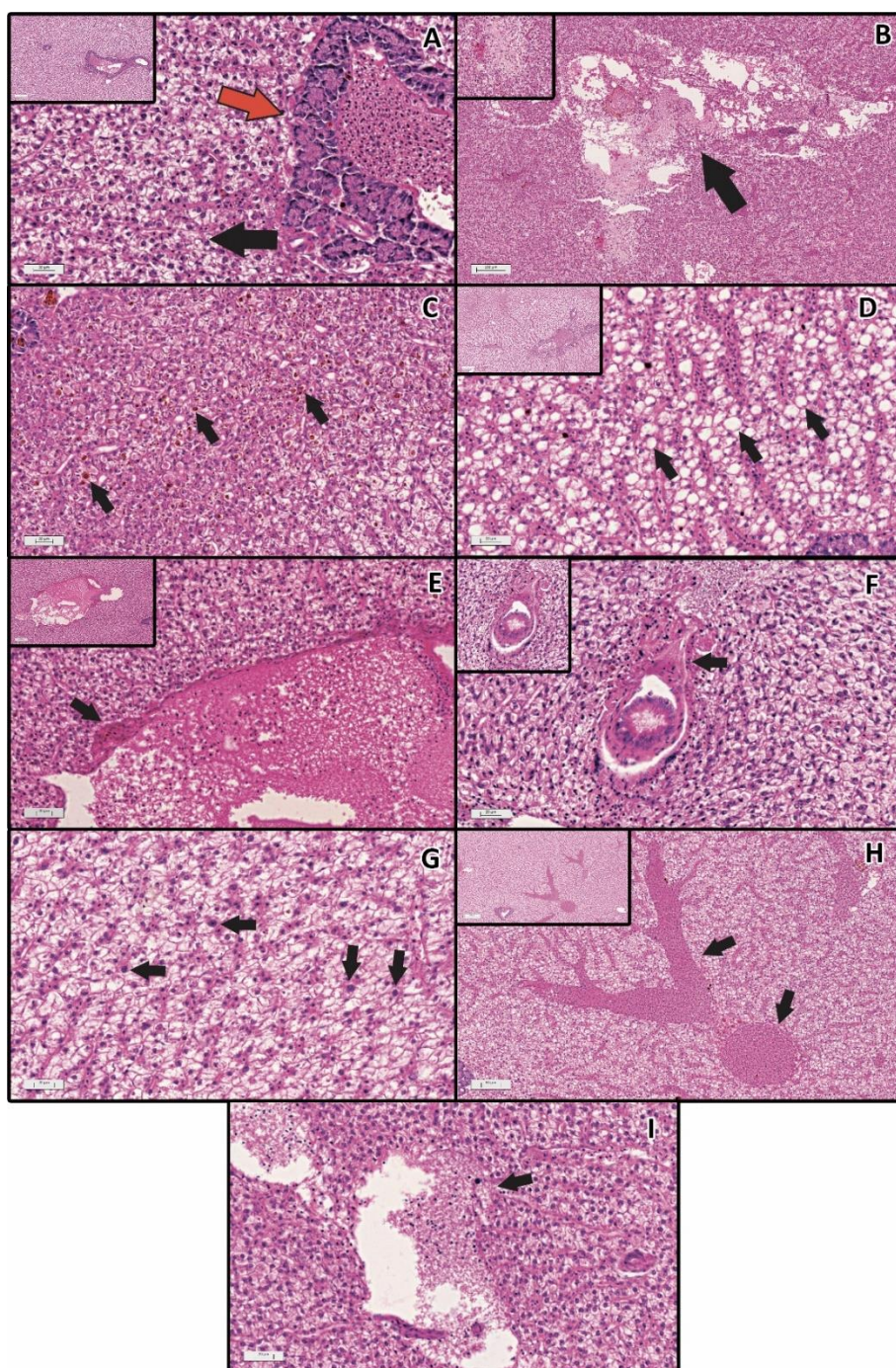


FIGURA 14. ÍNDICE DE LESÃO SEGUNDO BERNET ET AL. (1999) EM FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO ESTUDO AGUDO. LETRAS MOSTRAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE OS TEMPOS DE CADA DOSE. * E # MOSTRAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE AS DOSES. $P > 0,05$.

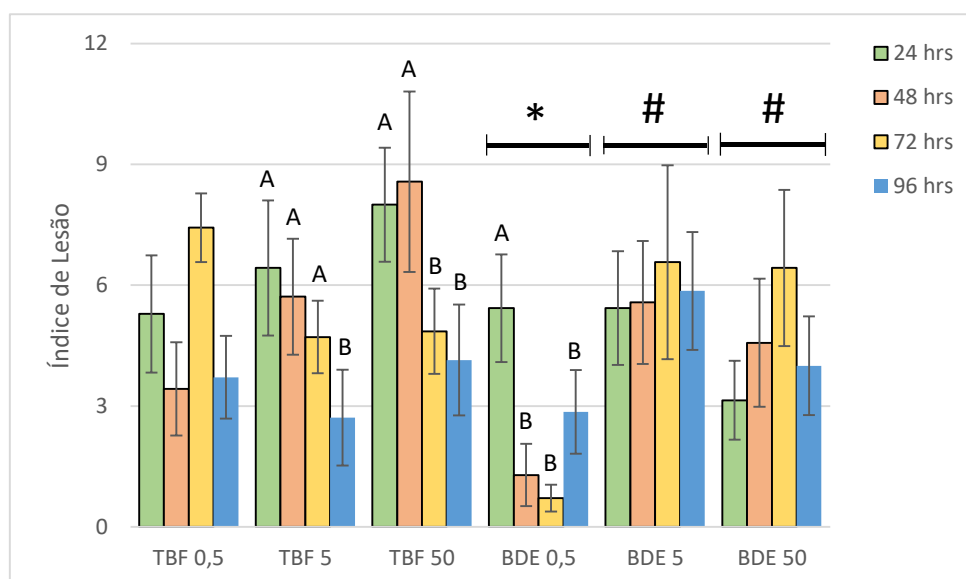


TABELA 17. INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), DO ESTUDO SUBCRÔNICO.

	Controle	TBF 0,5	TBF 5	TBF 50	BDE 0,5	BDE 5	BDE 50
Necrose	12%	50%	70%	80%	100%	83%	83%
Colestase	0%	20%	38%	60%	33%	66%	41%
Esteatose	25%	20%	15%	20%	25%	25%	25%
Granulomatose perivascular	8%	0%	0%	10%	8%	8%	8%
Granulomatose peritubular	8%	20%	0%	0%	0%	8%	16%
Resposta inflamatória	8%	0%	15%	10%	0%	12%	8%
Depósitos hialínicos	41%	0%	0%	20%	25%	16%	25%
Congestão vascular	0%	0%	0%	10%	8%	8%	16%
Hemorragia	8%	20%	0%	10%	16%	33%	16%
Núcleo pleomórficos	0%	0%	0%	10%	0%	8%	0%
Diferenciação tecidual	0%	0%	0%	0%	8%	16%	0%
Neoplasia	0%	0%	0%	0%	8%	8%	0%
Tumor maligno	0%	0%	0%	0%	0%	0%	8%

FIGURA 15. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), PROVENIENTES DO ESTUDO SUBCRÔNICO. (A) TECIDO COM ASPECTO NORMALEM INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE; TECIDO HEPÁTICO (SETA PRETA); TECIDO PANCREÁTICO (SETA VERMELHA). (B) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A TBF 50. (C) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO TECIDO PANCREÁTICO EXPOSTO A BDE 50. (D) ÁREA DE NECROSE (SETA PRETA) NO VASO SANGUÍNEO EXPOSTO A BDE 0,5. (E) COLESTASE (SETA PRETA) NP TECIDO HEPÁTICO EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A TBF50. (F) ESTEATOSE (SETAS PRETAS) NO TECIDO HEPÁTICO, EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A BDE 5. (G) GRANULOMATOSE PERIVASCULAR (SETAS PRETAS) EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO BDE 50. (H) GRANULOMATOSE PERITUBULAR (SETA PRETA) EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A BDE 50. (I) RESPOSTA INFLAMATÓRIA (SETA PRETA) EM INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE. (J) DEPÓSITOS HIALÍNICOS (SETA PRETA) EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO TBF 50. COLORAÇÃO: HEMATOXILINA E EOSINA.

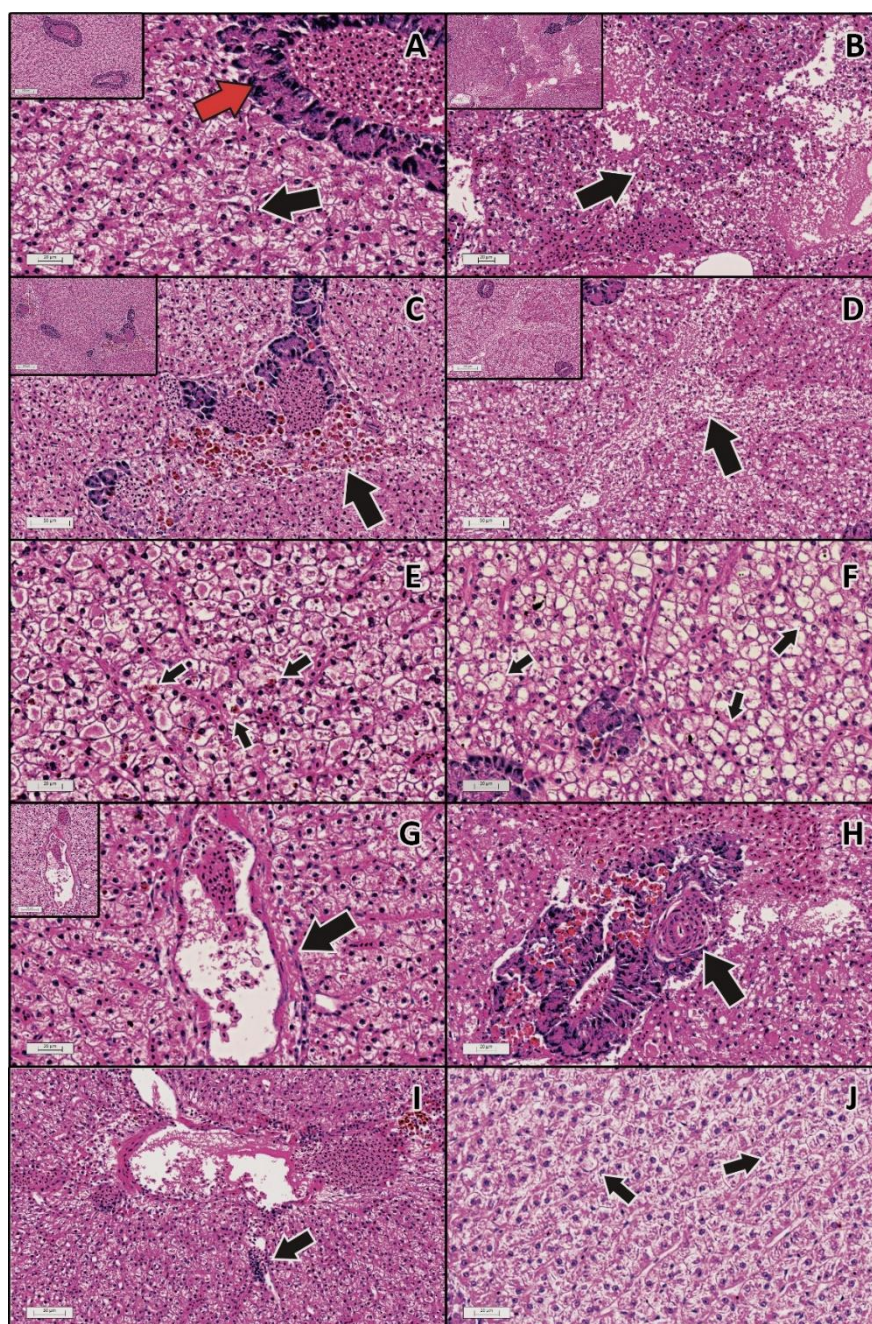


FIGURA 16. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), PROVENIENTES DO ESTUDO SUBCRÔNICO. (K) CONGESTÃO VASCULAR (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTO A BDE 0,5. (L) HEMORRAGIA (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTOS A BDE 50. (M) ÁREA DE DIFERENCIAÇÃO TECIDUAL (CÍRCULO VERMELHO) DO TECIDO HEPÁTICO, EXPOSTOS A BDE 5. (N) NEOPLASIA (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO EXPOSTOS AO BDE 50. (O) NEOPLASIA (SETA PRETA) NO TECIDO HEPÁTICO EXPOSTOS A BDE 50.

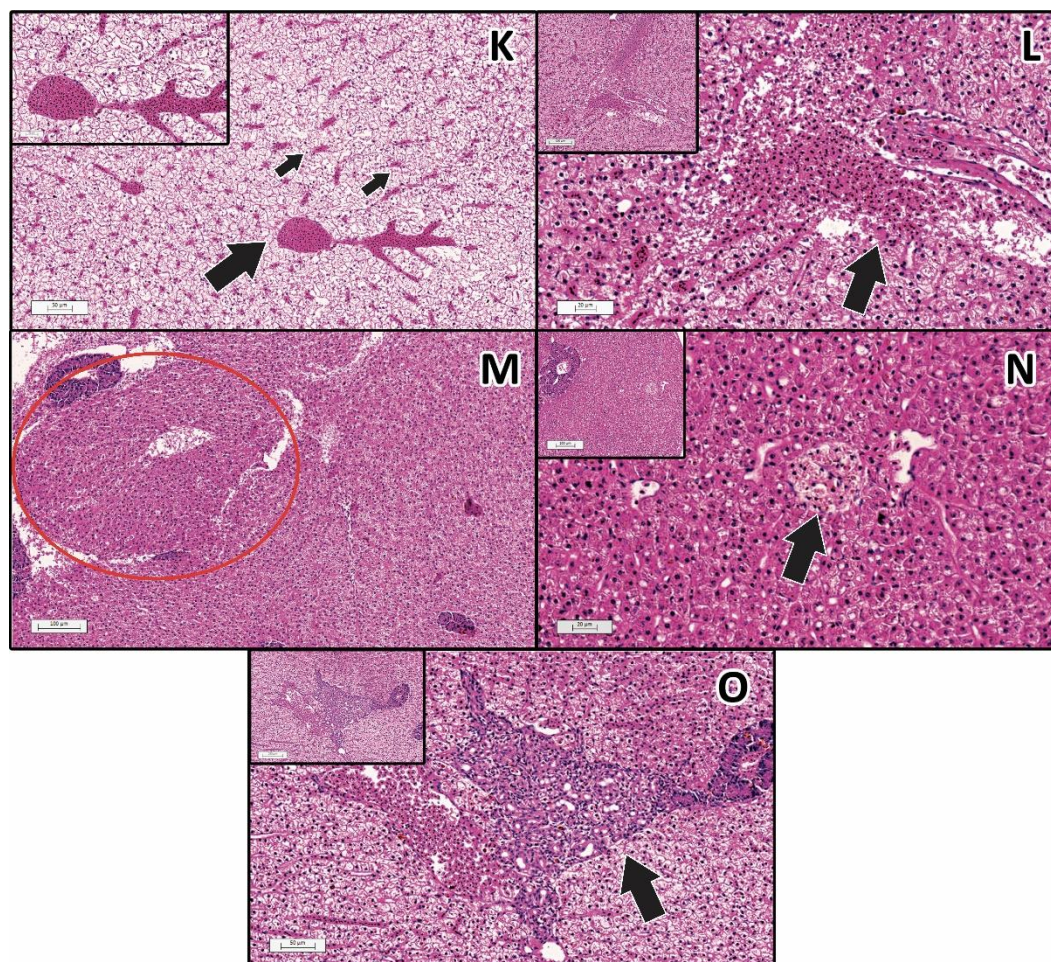
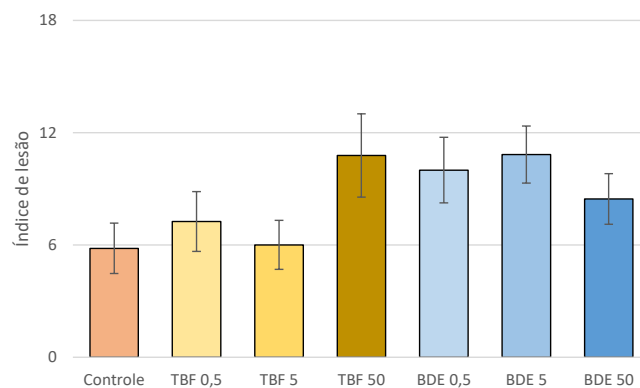


FIGURA 17. ÍNDICE DE LESÃO SEGUNDO BERNET ET AL. (1999) EM FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, EXPOSTOS AO TRIBROMOFENOL (TBF) E AO DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), NO ESTUDO SUBCRÔNICO.



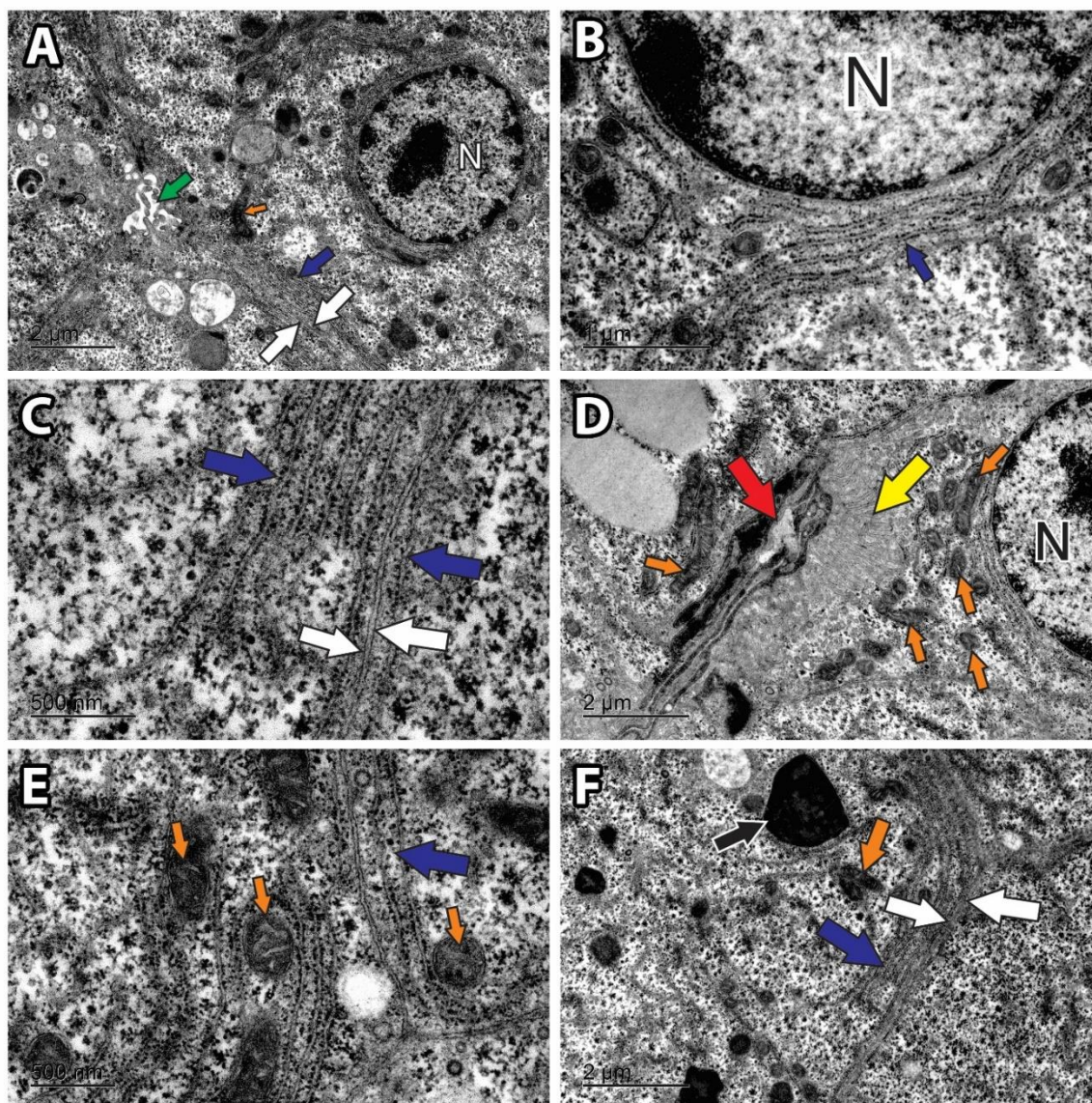
3.3.1.1 Microscopia eletrônica

Na microscopia eletrônica de transmissão, foi possível identificar ultraestruturas íntegras no fígado de animais do grupo controle, como núcleo esférico e canalículos biliares íntegros (figura 18 A). Retículo endoplasmático rugoso próximo ao núcleo (figura 18 B) e próximo a membrana plasmática (figura 18 C). Espaço de Disse próximo a sinusóides íntegros (figura 18 D). Organização citoplasmática bem definida (figura 18 E) e uma presença mais modesta de colestase (Figura F).

Nos estudos de ultraestrutura de animais expostos ao TBF 0,5, foi verificado alterações significativas como desarranjos no citoplasma como evidenciado em todas as micrografias (seta azul), onde observa-se uma desordem no citoesqueleto com reflexos na organização do retículo endoplasmático. Evidencia-se que os sinusóides e o espaço de Disse não possuem mais integridade em algumas regiões do tecido (figura 19 A). Foram encontradas alterações nucleares, como mostrado na Figura 19 B e C. Observou-se também a presença de grânulos de colestase em maior número.

No grupo contaminado com TBF 5, observa-se uma alteração significativa no citoplasma, onde as organelas não se apresentam nítidas em sua maior porção, sendo que parte do retículo e o núcleo foram deslocados para a periferia da célula (figura 20 A). Nota-se que o espaço deixado no citoplasma possui grânulos eletrodensos, evidenciando um depósito de partículas não identificadas (figura 20 B). Foi observada uma alteração no nucléolo onde é evidenciado um envoltório eletrtransparente (Figura 20 C). Outras alterações ultraestruturais como a formação de grânulos de colestase em grande quantidade e desestruturação do citoplasma.

FIGURA 18. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* DO GRUPO CONTROLE. NÚCLEO (N); MEMBRANA PLASMÁTICA (SETA BRANCA). CANALÍCULO BILIAR (SETA VERDE). RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (SETA AZUL). MITOCÔNDRIAS (SETA LARANJA). SINUSÓIDE (SETA VERMELHA). ESPAÇO DE DISSE (SETA AMARELA). GRÂNULO DE COLESTASE (SETA PRETA).



No Grupo contaminado com TBF 50, observa-se uma desordem mais acentuada no citoplasma, assim como um aumento da quantidade de grânulos de colestase em todas as eletromicrografias. Evidencia-se também acúmulo de lipídeo no citoplasma (figura 21 a) e depósitos hialínicos (figura 21 b), células em processo de morte celular por necrose (figura 21 g) e danos na estrutura dos canalículos biliares (figura 21 h).

No grupo contaminado com BDE 0,5, permanece a desorganização citoplasmática e lesões próximas a canalículos biliares (figura 22 A), assim como morte celular por necrose em células que compõem os canalículos (figura 22 C, E e F). Houve também surgimento de lesões no espaço de Disse e presença de grânulos de colestase (figura 22 B), assim como acúmulo de grânulos eletrondensos no citoplasma (figura 22 D e F).

No grupo exposto com BDE 5, houve a presença de morte celular por necrose próximas a cerosa do órgão (figura 23 A) e morte associada com células de melanomacrófago (figura 23 B). Outra lesão evidente nesse grupo foi observada no espaço de Disse com seguidas de lesões no endotélio dos sinusóides (figura 23 C e E).

No grupo exposto com BDE 5, houve a presença de morte celular por necrose próximas a cerosa do órgão (figura 23 A) e morte associada com células de melanomacrófago (figura 23 B). Outra lesão evidente nesse grupo foi observada no espaço de Disse com seguidas de lesões no endotélio dos sinusóides (figura 23 C e E).

No grupo contaminado com BDE 50, houve a presença de alterações nucleares e desorganização do citoplasma (figura 24 A e B). Foram observadas ainda alterações no espaço de Disse e uma evidência de dano direto na célula (figura 24 C) assim como hemorragia seguida de células em necrose (figura 24 D).

FIGURA 19. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* PROVENIENTES DO GRUPO TBF 0,5. NÚCLEO (N); NÚCLEO ALTERADO (Na); RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (SETA AZUL); SINUSÓIDE (SETA VERMELHA); ESPAÇO DE DISSE (SETA AMARELA); GRÂNULOS DE COLESTASE (SETA PRETA).

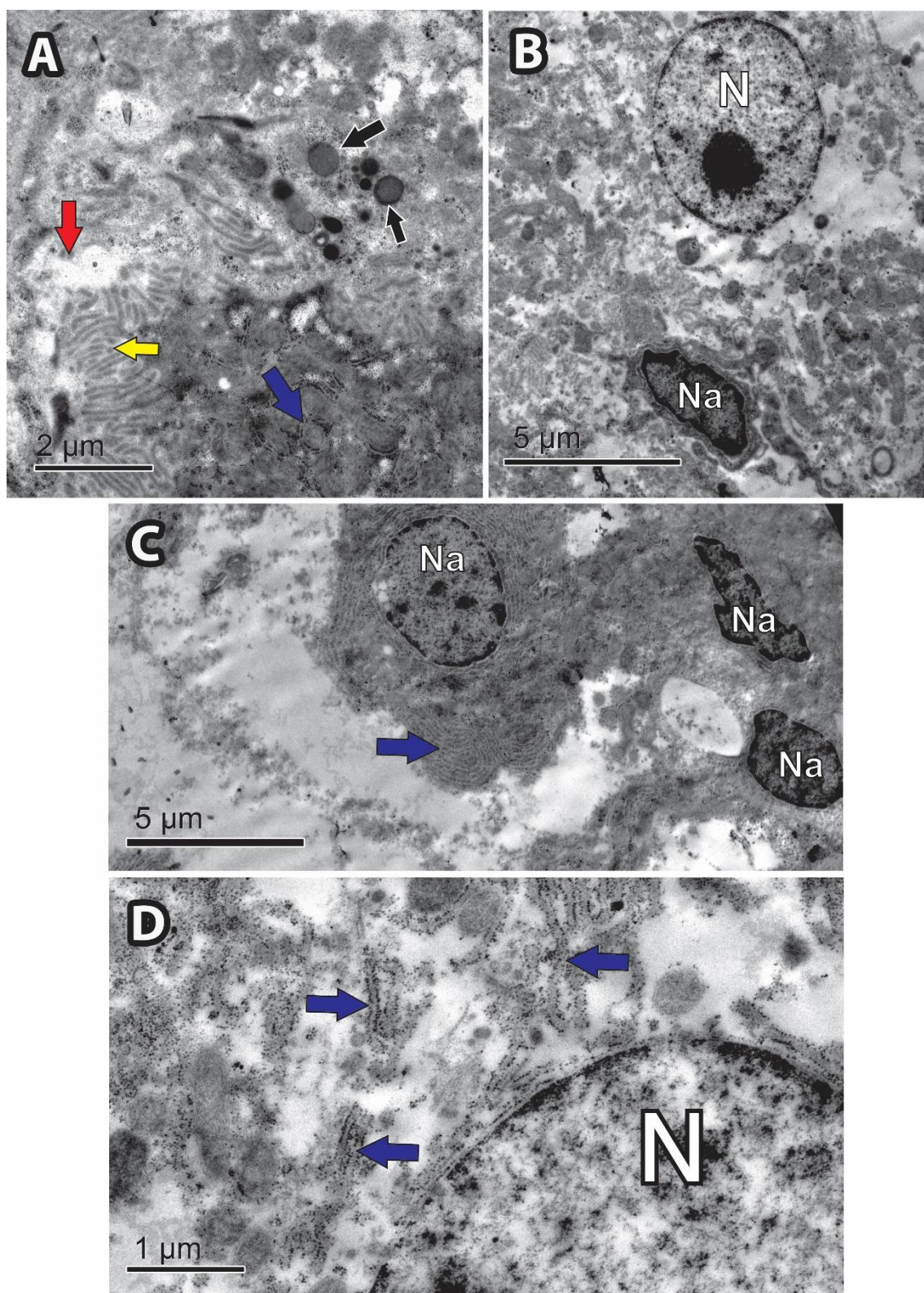


FIGURA 20. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE *O. NILOTICUS* PROVENIENTES DO GRUPO TBF 5. NÚCLEO (N); RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (SETA AZUL). MITOCÔNDRIAS (SETA LARANJA). GRÂNULOS DE COLESTASE (SETA PRETA). ESPAÇOS CITOPLASMÁTICOS COM ASPECTO DIFUSO (SETA VERMELHA); NUCLÉOLO ALTERADO (SETA BRANCA).

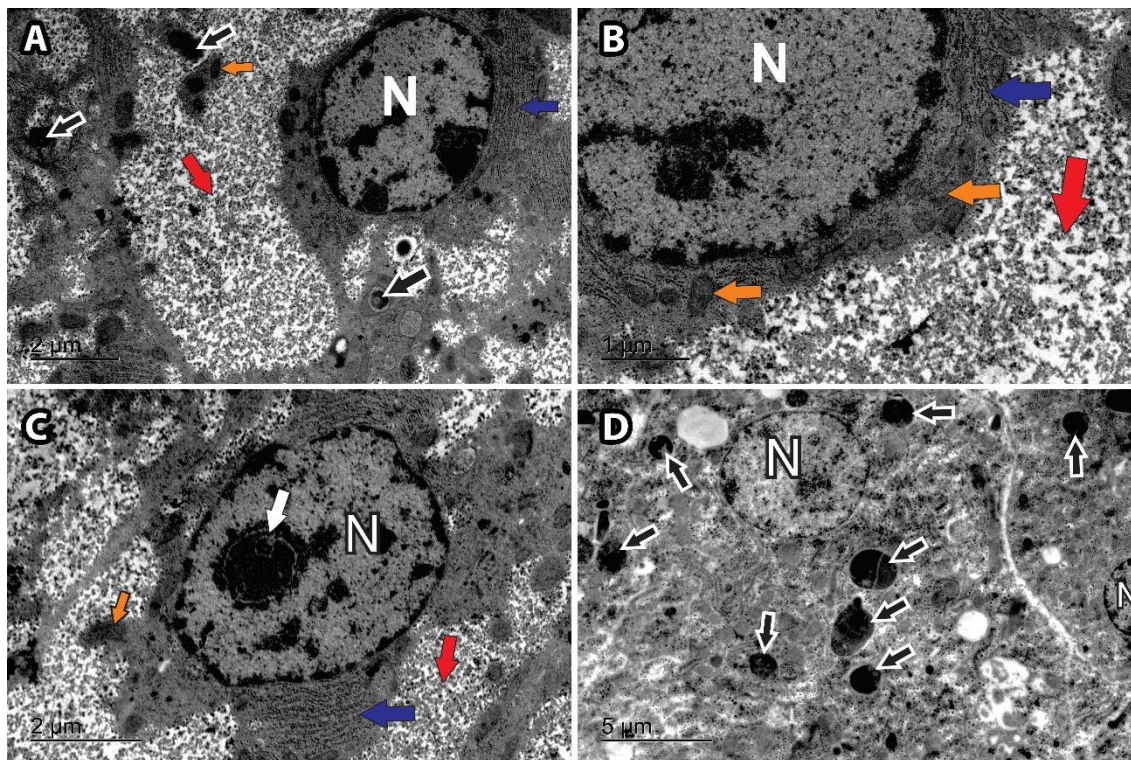


FIGURA 21. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* PROVENIENTES DO GRUPO TBF 50. NÚCLEO (N). NÚCLEO ALTERADO (Na). RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (SETA AZUL). GRÂNULOS DE COLESTASE (SETA PRETA). ACÚMULO LIPÍDICO (SETA LARANJA). DEPÓSITO HIALÍNICO (SETA VERMELHA). CÉLULA EM PROCESSO DE MORTE POR NECROSE (SETA AMARELA). CANALÍCULO BILIAR (SETA VERDE).

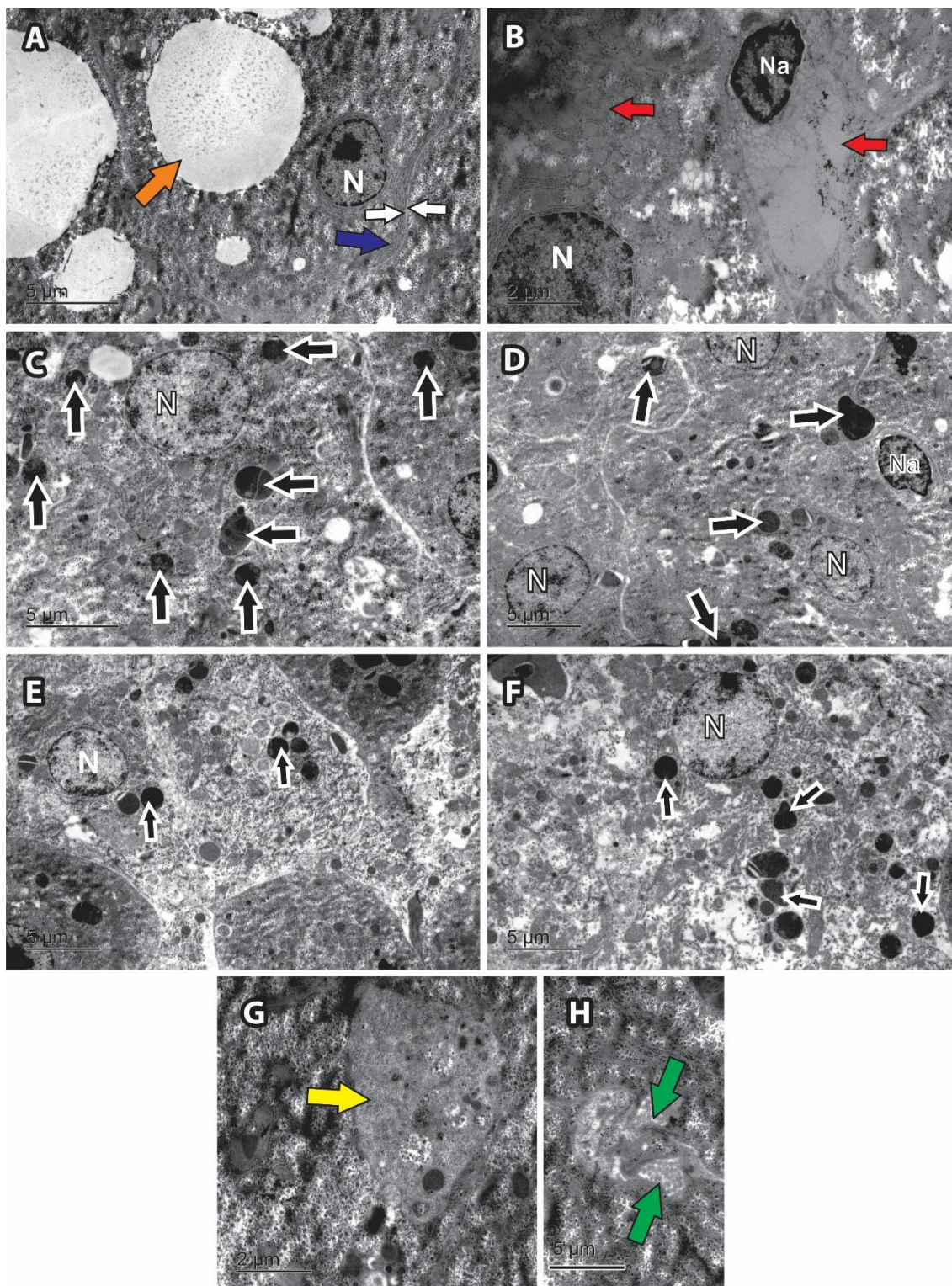


FIGURA 22. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* PROVENIENTES DO GRUPO BDE 0,5. NÚCLEO ALTERADO (NA). MEMBRANA PLASMÁTICA (SETA BRANCA). MITOCÔNDRIA (SETA LARANJA). GRÂNULOS DE COLESTASE (SETA PRETA). ACÚMULO LIPÍDICO (SETA ROXA); CÉLULA EM PROCESSO DE MORTE POR NECROSE (SETA AZUL); CANALÍCULO BILIAR (SETA VERDE). SINUSÓIDE (SETA VERMELHA); ESPAÇO DE DISSE (SETA AMARELA).

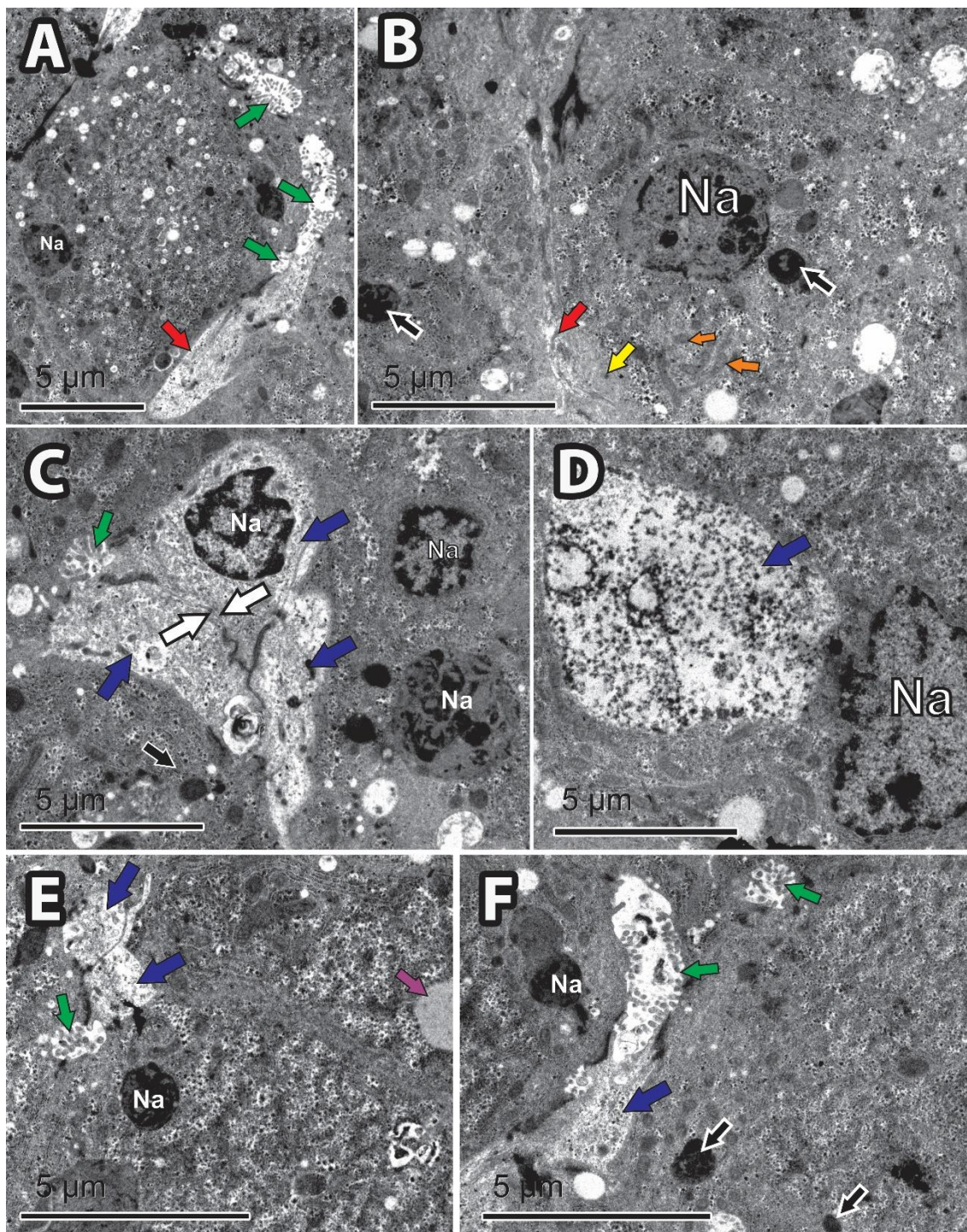


FIGURA 23. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* PROVENIENTES DO GRUPO BDE 5. NÚCLEO (N). SINUSÓIDE (SN). CÉLULA EM PROCESSO DE MORTE POR NECROSE (SETA AZUL); MELANOMACRÓFAGO (CÍRCULO VERMELHO); ESPAÇO DE DISSE (SETA AMARELA); ENDOTÉLIO (SETA VERMELHA).

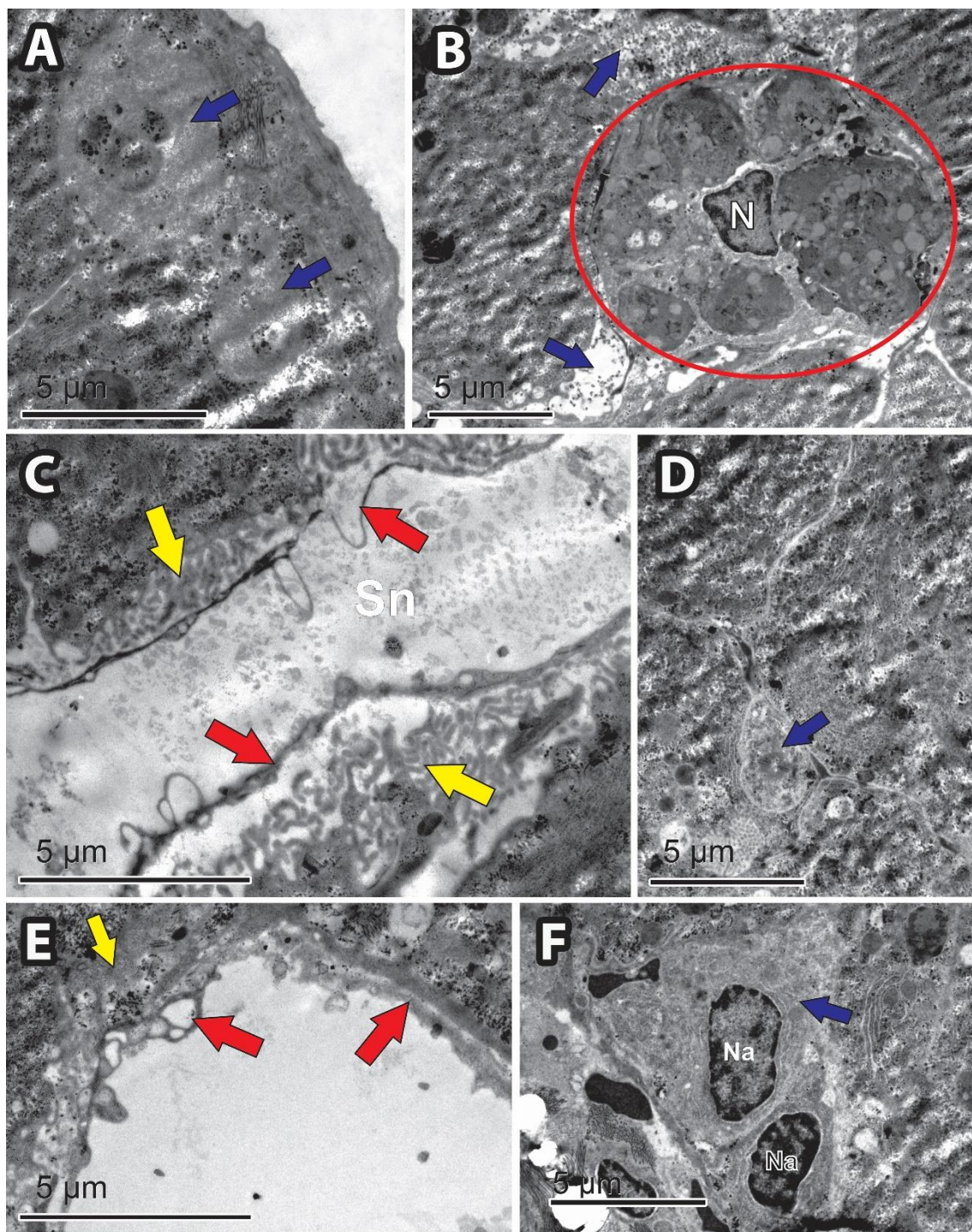
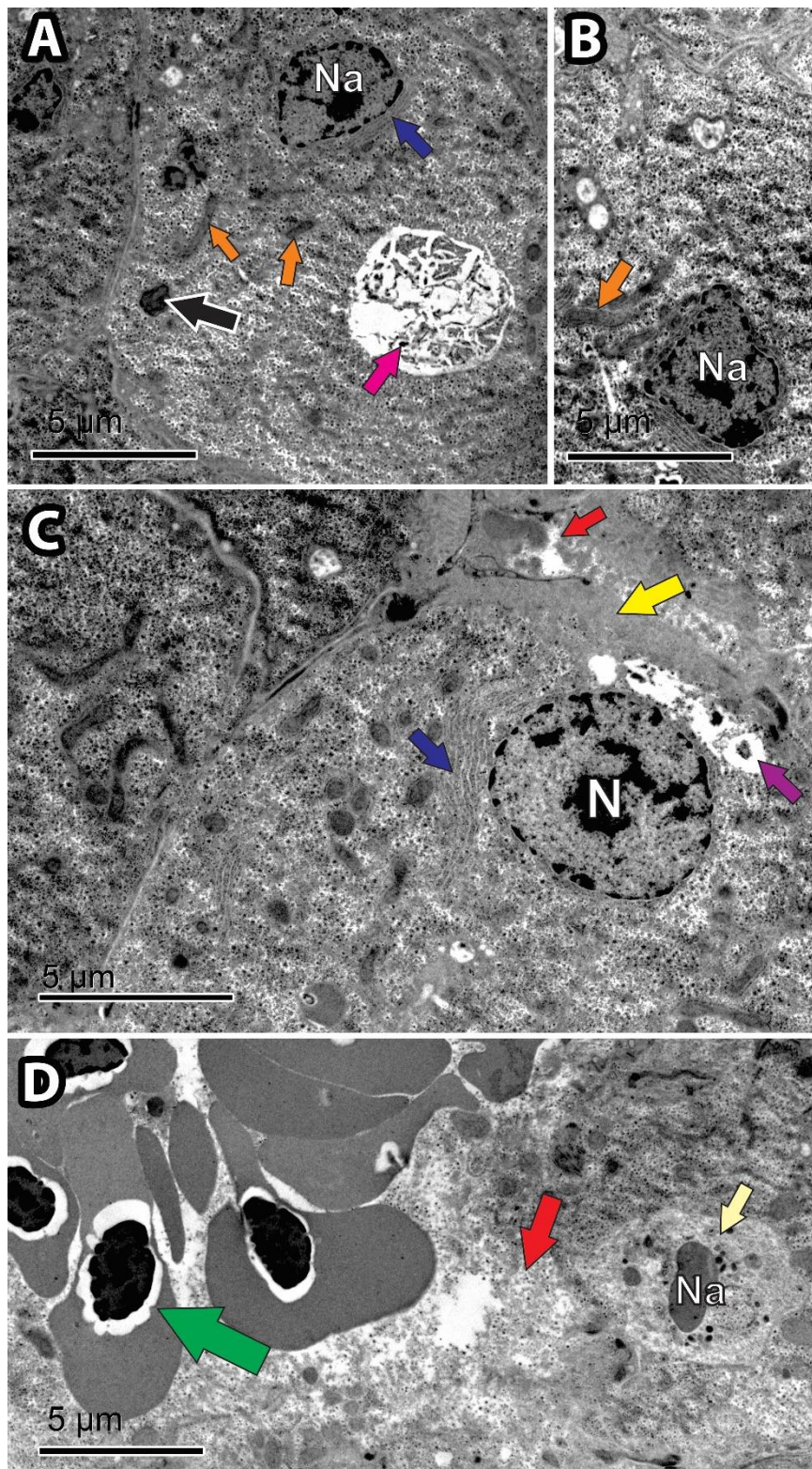
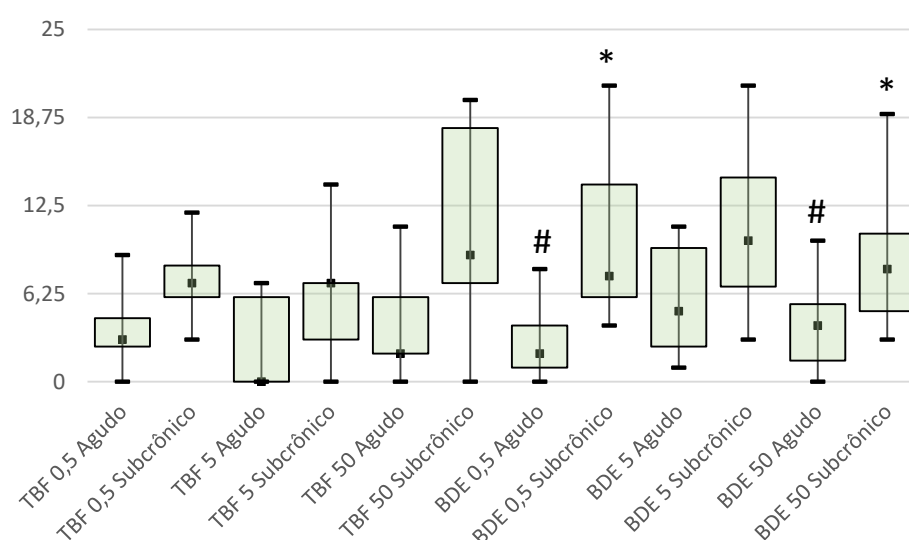


FIGURA 24. ULTRAESTRUTURA DE HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* PROVENIENTES DO GRUPO BDE 50. NÚCLEO (N). NÚCLEO ALTERADO (NA). ERITRÓCITO (SETA VERDE); RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (SETA AZUL); MITOCÔNDRIAS (SETA LARANJA); GRÂNULOS DE COLESTASE (SETA PRETA). CÉLULA EM PROCESSO DE MORTE POR NECROSE. (SETA BEGE); HEMORRAGIA (SETA VERMELHA); ESPAÇO DE DISSE (SETA AMARELA); ACÚMULO DE SUBSTÂNCIA DESCONHECIDA (SETA ROSA); PROCESSO INICIAL DE NECROSE (SETA ROXA).



Para verificar se houve diferença nos índices de lesão entre os experimentos agudo e subcrônica, foi comparado o grupo 96 horas com as doses do experimento subcrônico. Houve diferença estatística quando comparadas a dose de BDE 0,5 e BDE 50, entre os experimentos. Observa-se também a tendência de um aumento nos índices de lesão para o experimento subcrônico.

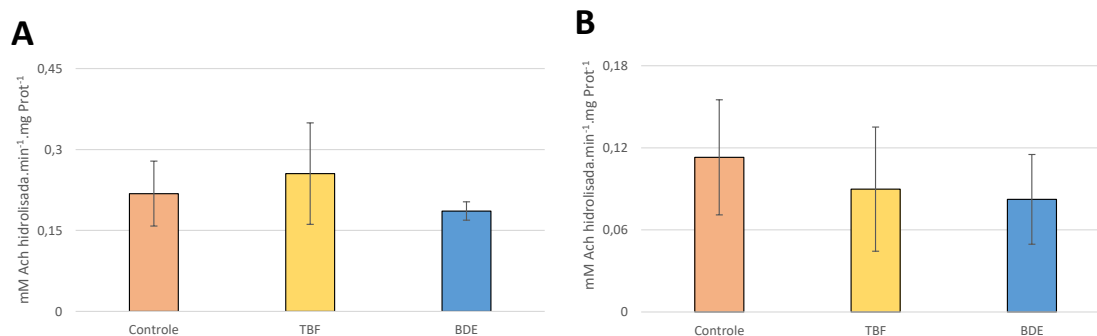
FIGURA 25. COMPARAÇÃO ENTRE O ÍNDICE DE LESÃO NO FÍGADO DE ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS*, APÓS EXPOSIÇÃO AO TRIBROMOFENOL (TBF) E DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), COMPARANDO O GRUPO 96 HORAS DO EXPERIMENTO AGUDO COM O EXPERIMENTO SUBCRÔNICO.



4.4 NEUROTOXICIDADE

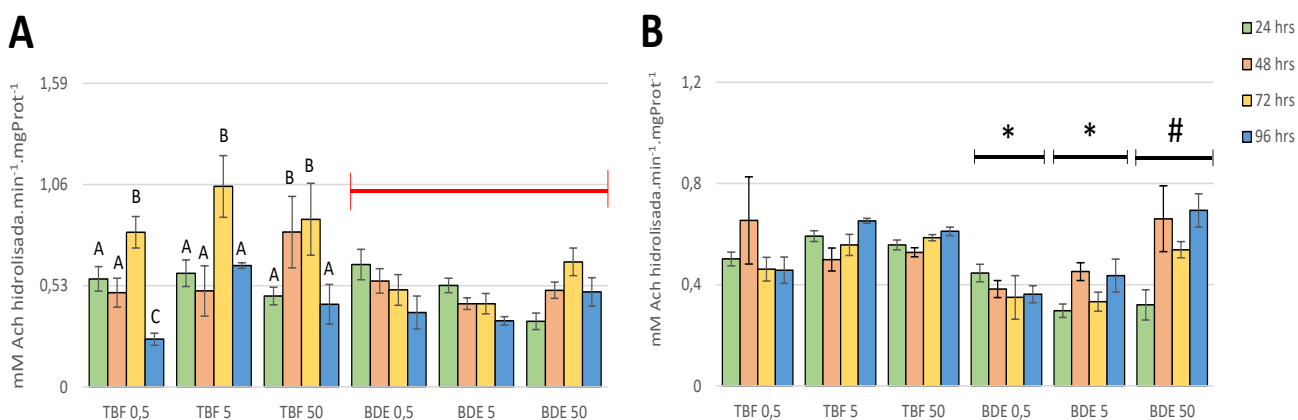
Não houve diferença estatística significativa na atividade da acetilcolinesterase, tanto para músculo, quanto para cérebro nos indivíduos expostos no experimento piloto.

FIGURA 26. ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* APÓS EXPOSIÇÃO AO TRIBROMOFENOL (TBF) E DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADO NO ESTUDO PILOTO. (A) MÚSCULO. (B) CÉREBRO.



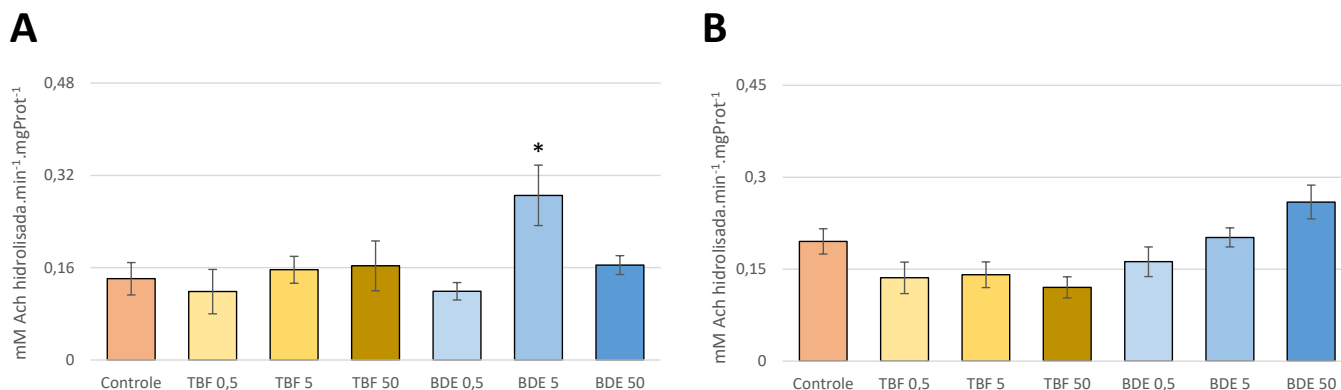
Para o experimento agudo, foram realizados ANOVA de duas vias, considerando as variáveis dose e tempo independentes e a interação entre dose e tempo. Foi observada diferença estatística significativa na atividade de acetilcolinesterase em músculo, para a variável tempo em TBF e interação dose e tempo para BDE. Já em cérebro, houve diferença na variável dose para BDE.

FIGURA 27. ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* APÓS EXPOSIÇÃO AO TRIBROMOFENOL (TBF) E DECABROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADO NO ESTUDO AGUDO. (A) MÚSCULO; BARRA VERMELHA INDICA $F = 2,8$ E $P = 0,02$. (B) CÉREBRO. AS LETRAS INDICAM DIFERENÇA NOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO. * E # INDICAM DIFERENÇAS ENTRE AS DOSES. A BARRA VERMELHA REPRESENTA DIFERENÇA NA INTERAÇÃO DOSE E TEMPO. $P > 0,05$.



Houve um aumento significativo na atividade da acetilcolinesterase em músculo de indivíduos provenientes do grupo BDE 5, em relação ao controle.

FIGURA 28. ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM ANIMAIS DA ESPÉCIE *O. NILOTICUS* APÓS EXPOSIÇÃO AO TRIBROMOFENOL (TBF) E DECA-BROMODIFENIL ÉTER (BDE), UTILIZADO NO ESTUDO SUBCRÔNICO. (A) MÚSCULO (B) CÉREBRO. * INDICAM DIFERENÇA EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE. $P > 0,05$.



4. DISCUSSÃO

O desenho experimental aplicado neste estudo foi inédito para os poluentes testados, portanto, houve a necessidade de realizar um experimento piloto com o intuito de planejar os demais experimentos: exposição aguda de até 96 h e subcrônica de 70 dias. Para o estudo piloto foi escolhida uma dose intermediária dentre às que se pretendia testar nos experimentos subsequentes (0,5; 5 e 50 ng.g⁻¹). A escolha destas doses se baseou na revisão escrita por Ezechiáš e colaboradores (2014) onde a concentração de ambos os compostos, em sedimento de rios, varia na faixa de 30 a 400 ng.g⁻¹, dependendo da área de estudo. Peixes alimentam-se, em média, de 30% do peso médio corpóreo em condições ambientais normais. Cerca de 8% da alimentação é composta por lipídeos, fonte favorável para a aderência de compostos hidrofóbicos, como o BDE-209 e TBF (VAN DER OOST; et al, 2003). Segundo RANG et al. (2007) farmacologicamente 30% de compostos hidrofóbicos são absorvidos pelo trato gastrointestinal de peixes, variando pouco entre as espécies. Considerando a faixa média da concentração de poluente encontrada no ambiente e os cálculos referentes a alimentação, os peixes poderiam ingerir dependendo do seu habito alimentar algo na faixa de 2,8 ng a 288 ng de compostos lipofílicos por vez que se alimentasse. Sendo assim, as concentrações utilizadas neste trabalho se justificam como concentrações realísticas do ponto de vista ambiental e de risco de exposição para a biota. Porém, a grande maioria os estudos referem-se à indução de efeito através de métodos invasivos, não transmitindo a realidade

ambiental. Tanto o BDE-209, como TBF são compostos altamente hidrofóbicos e acumulam no sedimento em ambientes aquáticos destacando o presente estudo, onde a via alimentar parece ser a mais importante para os contaminantes estudados (FENG et al., 2015; HALDÉN et al., 2010)

Em termos gerais o composto TBF, com os dados obtidos, aparentemente é mais tóxico em períodos agudos de exposição enquanto o BDE está mais relacionado com efeitos no período mais longo de exposição. As análises em níveis mais complexos de organização biológica como o índice hepatossomático, por exemplo, mostram que a exposição ao TBF neste tipo de biomarcador parece apresentar uma maior toxicidade em relação ao BDE. Esta hipótese é baseada em uma ascendência observada após 48 horas de exposição, não observada para os outros tempos inclusive para o BDE. Esta, no entanto, é uma hipótese que necessita de mais estudos para abordar este tipo de avaliação. Por outro lado, a ausência de efeito nos animais expostos a um maior tempo poderia ser explicada por algum tipo de adaptação, ou modulação do dano, tornando-o menos evidente, mas igualmente precisaria de mais estudos.

Vários dos efeitos observados em peixes quando expostos a xenobióticos apresentam como base para explicar os diversos danos um distúrbio na resposta antioxidante, alterando o estado oxido redutor celular, fazendo-o tender a um estado mais oxidativo. Isto pode ocasionar danos moleculares que se traduzem em eventos mais complexos. Estes eventos podem vir a prejudicar várias funções celulares acarretando muitas vezes na morte da própria célula. Os resultados deste estudo mostraram que o TBF apresenta um potencial tóxico mais acentuado em períodos curtos de exposição, enquanto o BDE está mais relacionado com efeitos associados com um tempo maior de exposição. Estas afirmações se baseiam no aumento dos danos em lipídeos e proteínas observados para todas as concentrações testadas de BDE, ao passo que apenas TBF 50 e TBF 5 mostraram o mesmo tipo de efeito respectivamente para estas mesmas moléculas. Os efeitos observados neste mesmo tipo de análise, no entanto, com uma diminuição nos danos para os indivíduos expostos aos contaminantes foi concentração dependente para o TBF, sendo que para a carbonilação de proteínas o tempo também mostrou influenciar neste parâmetro. Embora contrário ao que se espera observar, uma diminuição dos danos nestes dois parâmetros pode representar algum tipo de efeito do tipo hormesis. Neste caso, a célula pode

apresentar um conjunto de respostas que em um primeiro momento se reflete em um esforço de manter a integridade celular, mas que pode não se configurar em tempos mais prolongados de exposição, como observado nos resultados subcrônicos.

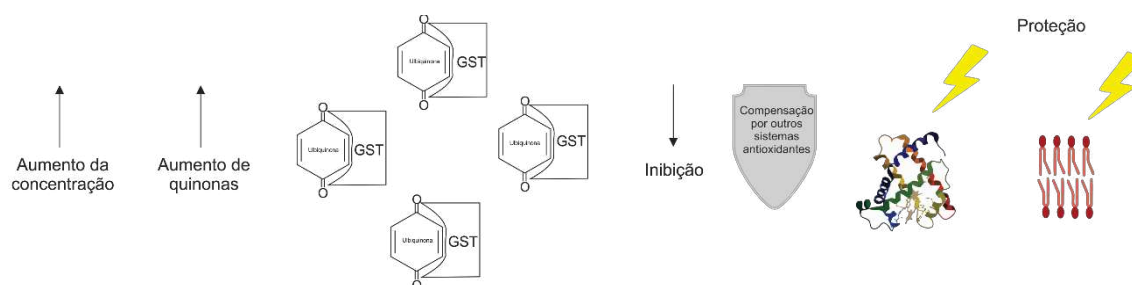
Trabalhos como os de Zhao e colaboradores (2011) e Xie e colaboradores (2014) utilizaram-se de doses de BDE-209 na ordem de 0,004 a 5 µg/g, efetuando injeção intraperitoneal a cada 3 e 6 dias, respectivamente. Os resultados obtidos mostram uma relação dose-efeito no sistema antioxidante do fígado, observando um aumento de atividade, dose dependente, da glutathione redutase e glutathione S-transferase. Estes dados corroboram os encontrados neste estudo para a GSH, diferentemente do encontrado para a GST, a qual diminui significativamente para o DBE de forma dose dependente. Tais eventos permitem relacionar que apesar da maior dose administrada no trabalho citado acima, o mecanismo envolvido com a absorção pode ser o grande diferencial, visto que no presente estudo a dose foi oral, o que torna os dados mais representativos. Isto não permite apenas confrontar o método de exposição, mas também dar suporte aos outros dados gerados no presente estudo.

As variações dos níveis de tióis não protéicos encontradas no experimento agudo de exposição ao BDE nos diferentes tempos e concentrações, mostra que este evento é relativamente modulável dependendo da situação, quer seja como um mecanismo antioxidante. As primeiras horas mostram uma queda na concentração de tióis não protéicos, podendo ser o reflexo do papel da molécula como antioxidante, regulando, portanto, a homeostase celular. Já o aumento nas horas seguintes como observado em 48 para 72 horas pode significar uma ativação no metabolismo da molécula, seguido de queda em 96 horas para o grupo. Neste caso pode estar refletindo um aumento de moléculas oxidantes e, portanto, um recrutamento maior desta molécula. Estes dados de maneira sistemática confirmam o papel do BDE na indução do estresse oxidativo, mas que em termos gerais é regulado pelo sistema antioxidante, sem maiores danos para as macromoléculas celulares, mecanismo descrito anteriormente. O fato do BDE e do TBF diminuírem a atividade da GST pode significar que o metabolismo não é alterado a curto prazo e ao mesmo tempo, confirmar o efeito pró oxidantes destas moléculas sem afetar a curto prazo o mecanismo antioxidantes das células do fígado.

Anatomicamente, ao ser absorvido no intestino, o fígado é o próximo órgão onde o contaminante chega. Os compostos lipofílicos em geral podem ser transformados no tecido hepático em substâncias mais hidrófilas. Este processo é chamado de biotransformação (metabolismo do xenobiótico) e pode ocorrer por duas vias principais: pela adição ou clivagem de um grupo funcional (denominado funcionalização, ou "Fase I" do metabolismo); e por acoplamento do xenobióticos (ou seu metabólito primário) com um substrato endógeno (conjugação denominado, ou "fase II" metabolismo - embora as reações de fase II podem ocorrer sem a fase I) (BOELSTERLI, 2007).

Pouco ainda se sabe do papel da GST no metabolismo dos bromados. Moléculas análogas ao BDE e o TBF, como é o caso dos Bifenilaspolicloradas (PCB's) podem sofrer metabolização por um sistema microsomal de mono-oxigenases hepáticas, causando a quebra da ponte entre os anéis benzênicos, criando quinonas policloradas (WALLER, et al, 1999). As quinonas são conhecidas por inibir a atividade da GST em experimento utilizando a enzima extraída de frangos (TIAN et al., 2012). Essa seria uma hipótese para explicar a queda na atividade de GST no experimento agudo de ambos os contaminantes, uma vez que suas estruturas químicas são muito semelhantes.

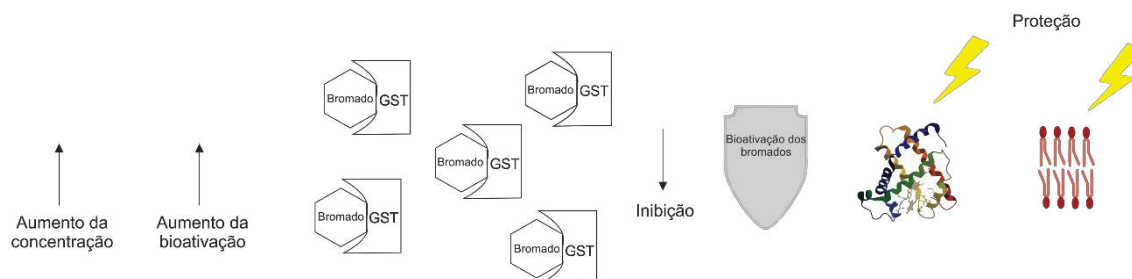
FIGURA 29. HIPÓTESE 1 PARA EXPLICAR A QUEDA NA ATIVIDADE DE GST NO EXPERIMENTO AGUDO DE AMBOS OS CONTAMINANTES.



Por outro lado, autores como BENTO e colaboradores (2007) e BROWNE e colaboradores (2009) demonstraram que a enzima é uma possível via de debromação. A GST catalisa a reação de hidroxilação utilizando uma molécula de GSH, deslocando o bromo da molécula. Uma hipótese para a diminuição da atividade da GST no experimento agudo seria o fato de uma grande concentração de enzimas estariam bioativando moléculas de bromados ao mesmo tempo, inibindo-as temporariamente, impedindo que os poluentes lesem a célula,

explicando assim a baixa nos danos a macromoléculas mostrados nesse ensaio agudo (Figura 20).

FIGURA 30. HIPÓTESE 2 PARA EXPLICAR A QUEDA NA ATIVIDADE DE GST NO EXPERIMENTO AGUDO DE AMBOS OS CONTAMINANTES.



Os efeitos do estresse oxidativo foram evidentes no estudo sub-crônico, uma vez que houve danos a macromoléculas nos grupos de TBF 50ng.g⁻¹ e em todas as doses de BDE-209. Carbonilação de proteínas é um dos danos em macromoléculas, onde a introdução de grupamentos carbonilas, principalmente aldeídos e cetonas, em uma estrutura de proteína resulta em perda de função da mesma. As modificações químicas que ocorrem através de diferentes mecanismos de reação que podem ser resumidas como uma oxidação direta de vários resíduos de aminoácidos e induzida por radicais hidroxila. Este radical pode ser gerado por reações de oxidação que ocorrem na célula, devido a exposição a xenobióticos. Esses radicais induzem a oxidação de prolina, arginina, lisina, e cadeias laterais de resíduos de treonina para aldeídos ou cetonas (COLOMBO et al., 2015). Se as condições micro-ambientais favorecem a geração de radicais livres em compartimentos hidrofóbicos de uma célula, os lipídios, consequentemente biomembranas podem ser peroxidadas, danificando o funcionamento regular da célula. Os danos induzidos por radicais em determinado local da membrana lipídica são facilmente propagados e amplificados em uma forma de reação em cadeia, espalhando-se rapidamente em toda a membrana (BOELSTERLI, 2007).

Uma hipótese para geração de estresse oxidativo está na própria estrutura química das moléculas de polibromados. Muitos estudos têm demonstrado que a toxicidade de BDE-209 é relativamente baixa, enquanto que a toxicidade pode ser devida a metabolitos, tais como BDES hidroxilados (OH-BDES) e éteres difenílicos bromados metoxilados (MeO-BDES), congêneres de menor bromação

e o próprio átomo de bromo, uma vez que, devido a posição na tabela periódica, são altamente reativos (FENG et al., 2015). No entanto, as rotas de metabolização do BDE-209 não foram claramente abordadas ainda. Alguns estudos toxicológicos têm mostrado que os éteres difenílicos bromado mais baixos, são mais tóxicos do que o maior éter difenílico bromado (HOOPER E MCDONALD, 2000 , Xie et al., 2014). Também tem sido sugerido que as enzimas deiodinase desempenham um papel na debromação de BDE's em peixes devido à semelhança estrutural com os hormônios da tireoide.

As análises histopatológicas constituem um biomarcador que de certa forma permite a visualização de danos ocorridos em níveis mais simples de organização biológica os quais possam ter comprometido a integridade celular. Embora através do índice de lesão, tanto o experimento piloto como o sub-crônico não tenham apresentado diferença estatística entre os grupos expostos em relação ao controle, uma análise da incidência de alterações podem apontar alguns aspectos importantes quanto ao efeito tóxico destes contaminantes. Curiosamente, neste caso, há evidência de alteração no sistema antioxidante levando a um estresse oxidativo para os dois contaminantes na exposição subcrônica, não se reflete nos dados histopatológicos. Os tipos de alterações morfológicas foram mais evidentes em indivíduos expostos ao TBF nas primeiras 24 horas de exposição enquanto para o BDE os danos foram observados em maior incidência após 96 horas. Estes dados se confirmam no experimento piloto, onde o tempo de exposição é um pouco maior. A necrose é um tipo de morte celular onde danos em membrana ou a falência na produção de ATP na célula são as causas mais proeminentes. Estes resultados em especial não se explicam pelo estresse oxidativo no caso da exposição subcrônica, portanto, algum outro tipo de interação da molécula com a célula não investigado neste estudo, poderia ser a explicação para a morte celular. Até o presente momento não há estudos relacionando a exposição de BDE-209 e TBF em peixes e avaliação histopatológica, fazendo com que esse seja um dos trabalhos inéditos para esse biomarcador.

No estudo agudo, houve interferências tanto do tempo de exposição (TBF) como da concentração (BDE) no primeiro caso diminuindo o índice de lesão e no segundo caso aumentando o valor do índice. Porém, vale ressaltar que, mesmo que os dados tenham apresentado alguma normalidade no experimento

subcrônico em relação ao índice de lesão a incidência de danos como necrose, colestase, esteatose, depósitos hialínicos, congestão vascular, nos grupos de maior dose foi maior que no controle. Além disso alguns tipos de lesões degenerativas como os focos de neoplasia, tumores benignos e malignos encontrados em animais expostos aos dois tipos de poluentes após exposição subcrônica, são fortes evidências do grande potencial tóxicos destes contaminantes.

Os estudos histopatológicos respondem pela compreensão dos efeitos estruturais a nível tecidual, o que em termos favorece um diagnóstico importante. No entanto, quando observadas as alterações a nível ultraestrutural, alguns danos antes não observados passam a ser importantes no diagnóstico dos efeitos dos dois tipos de poluentes. Neste caso o alvo são as alterações em regiões celulares ou teciduais que se alteradas podem comprometer o funcionamento da célula ou do tecido. Dentre estas regiões se destacam o espaço de Disse, necroses, alterações na organização do citoplasma e alterações nos canalículos biliares.

Biomarcadores histológicos fornecem uma ferramenta poderosa para a detecção e caracterização de disfunções teciduais que comprometam a homeostase do tecido, mostrando danos que outras ferramentas moleculares não conseguem detectar (STENTIFORD et al., 2014). Bernet et al. (1999) apresenta algumas das vantagens da histopatologia como um biomarcador e propõe um índice de lesão, o qual agrega várias informações estruturais em torno de uma avaliação quantitativa. As alterações histológicas aparecem como uma resposta em médio prazo aos estressores sub-letais, e fornece um método relativamente rápido para detectar efeitos, especialmente sob exposição crônica. Devido ao fato do fígado desempenhar um papel chave no metabolismo, a avaliação histopatológica faz-se necessária juntamente com outras análises, o que favorece o diagnóstico.

O dano histopatológico mais comum e que foi presenciado neste estudo foi a presença de áreas de necrose. Essa alteração se dá por lesões em membranas e digestão de componentes intracelular (Rabitto et al, 2005), e representar um dano estrutural e funcional irreversível com graves consequências para a saúde organismo (STENTIFORD et al., 2003). Foi descrito extensivamente na literatura a presença de necrose após a exposição a xenonióticos (ALMEIDA E OLIVEIRA, 2014).

A colestase é uma disfunção hepática fruto de uma estagnação de sais biliares no interior dos hepatócitos, ou mesmo nos canalículos biliares. Devido ao fato da excreção ser mediada pelo citoesqueleto, desordens neste sistema celular podem levar ao seu acúmulo no tecido facilmente visível em microscopia de luz (ALMEIDA E OLIVEIRA, 2014). A desordem encontrada no citoplasma, evidenciada em ultraestrutura, pode estar relacionada a incidências de colestase nos animais contaminados. Isto se aplica visto que a incidência de colestase foi maior nesses grupos, tanto em microscopia de luz quanto em estudos ultraestruturais. Estes dados sugerem que o efeito dos poluentes em questão pode estar relacionado também com danos no citoesqueleto.

Em termos ultraestruturais tanto o TBF como o BDE são citotóxicos e apresentam graves lesões na célula que em curto ou médio prazo pode comprometer a integridade celular. Os efeitos para ambos os contaminantes são dose dependente onde para o TBF os eventos são intracelulares na sua maioria com desarranjo citoplasmático, espaços difusos no citoplasma associado na maior dose com a presença maior de colestase, acúmulo de lipídeos e depósitos hialínicos. Embora danos extracelulares como em canalículos biliares e morte celular ocorram, estes estão mais relacionados com a maior dose do poluente. Neste caso os danos nos canalículos possam explicar o aumento de colestase nesta dosagem.

Para o caso de exposição ao BDE, os danos ultraestruturais parecem ser mais expressivos comparativamente com o TBF. Já nas primeiras doses surgem danos nos canalículos, espaço de Disse e morte celular, as quais aumentam de intensidade em relação à dose culminando na maior dosagem com alterações nucleares, morte celular associada com os canalículos e sinusóides.

Os danos ultraestruturais deixam muito evidente que a porta de entrada dos poluentes relaciona-se claramente com os danos principalmente quando se trata da exposição ao BDE. Pode-se observar a presença com relativa frequência de morte celular associada com os sinusóides e canalículos biliares.

Embora tenham sido descritos danos relacionados com a estrutura tecidual dos animais expostos ao TBF e BDE, as alterações verificadas com as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, foram muito mais efetivas. Fica claro nestas análises que os poluentes apresentam um efeito concentração dependente corroborando com os dados de estresse oxidativo, situação não observada para

o índice de Bernet, por exemplo. Isto não significa que os dados histopatológicos não devam mais ser considerados, mas sim que quanto mais parâmetros são levantados, mais o diagnóstico é confiável. Neste caso a avaliação ultraestrutural foi determinante na relação de confiabilidade com os dados de estresse oxidativo para a exposição subcrônica.

A incidência de diferenciação celular e a presença de neoplasias e tumores nos animais contaminados com a maior dose de ambos os contaminantes, sugere que esses poluentes possuem potencial carcinogênico. Esta hipótese é reforçada pelas alterações nucleares facilmente notada, como a presença de núcleos com ausência de heterocromatina, núcleos alterados na sua forma e a presença de lesões nos nucléolos principalmente nos indivíduos expostos ao TBF 5. Vários aspectos podem resultar destas alterações, como danos na estrutura do DNA e/ou ativação de determinadas áreas do DNA podendo levar a diferentes condições de expressão gênica ou comportamento celular.

Resumindo, os danos ultraestruturais podem significar diferentes condições de alterações fisiológicas. Os danos na barreira de entrada para o órgão como o endotélio dos sinusóides, expõe o tecido hepático e representa o alto potencial citotóxico dos contaminantes testados neste estudo. De outra forma, as alterações nos canalículos biliares representam fisiologicamente para o tecido uma diminuição no fluxo de bile, podendo comprometer o papel do órgão na fisiologia do sistema digestório, caso perdure o dano. A bile é uma forma de excreção de poluentes e metabólitos destes pelo fígado, e, portanto, os danos observados na entrada do órgão e na saída do mesmo, são fortes evidências de graves danos hepáticos causados por estes contaminantes. Os danos celulares presentes caracterizam o papel citotóxico, mais especificamente hepatotóxico uma vez que a exposição foi natural. A presença de morte celular e outras alterações na fisiologia da célula, pode com o tempo comprometer a integridade do tecido diminuindo a capacidade do órgão, o que deve refletir negativamente na saúde do animal.

A neurotoxicidade é um biomarcador de importante relevância, uma vez que alterações nesse sistema podem ser interpretadas como variações no comportamento do animal. Os dados mostram que as relações dos dois contaminantes testados neste estudo são diferentes. Nota-se que a relação do TBF com o tecido do músculo apresenta um efeito em curto prazo muito distinto

do observado no cérebro, enquanto para o BDE o padrão é o mesmo para os dois tipos de tecido, mas apenas para o cérebro os dados são significativos obedecendo a uma relação dose dependente. Quando comparado com a exposição em médio prazo, os dados são igualmente distintos, sem alteração significativa, exceto para o grupo intermediário de BDE, onde um aumento na atividade foi observado. Por outro lado, observa-se que o efeito de ambos os contaminantes se relacionam com um aumento na atividade da AChE.

Alguns estudos relatam neurotoxicidade no desenvolvimento embriológico de ratos, associado com a exposição BDE-209, o que inclui diminuição da atividade locomotora e cognição (VIBERG et al., 2003). A exposição a BDE-209 altera a expressão de genes e proteínas envolvidas na sinapse e formação do axônio, morfologia neuronal, a migração de células e plasticidade sináptica (VIBERG et al., 2008 e DINGEMANS et al., 2011). Além disso, o BDE-209 foi descrito a causa para o stress oxidativo em neurónios, o que leva a morte neuronal apoptótica (CHEN et al., 2010 e COSTA E GIORDANO, 2007). Zhu e colaboradores. (2016) propuseram que a neurotoxicidade em ambientes com despejo de lixo eletrônico, poderia ser uma interação entre chumbo e BDE's, uma vez que em seus experimentos, o efeito da mistura potencializou o retardo do desenvolvimento neural em embriões de *Danio rerio*.

O hormônio tireoidiano é um fator de regulação para várias atividades cerebrais. Esta molécula é transportada pelo plasma e ultrapassa a barreira hematoencefálica associado à proteína transretina (KIM et al., 2015). O BDE-209 possui afinidade pela transretina, podendo ser transportada através da barreira hematoencefálica e assim causar efeitos diretos no sistema nervoso central (FENG et al., 2012b). A enzima Acetilcolinesterase é responsável pela hidrólise do neurotransmissor a acetilcolina em colina e ácido acético, controlando assim a corrente iônica em muitas membranas excitáveis (MAGNI et al, 2006). Geralmente, os estudos ecotoxicológicos mostram uma inibição da atividade da AChE em peixes, especialmente por pesticidas organofosforados, carbamatos e alguns metais (CRESTANI et al., 2007; JEMEC et al., 2010). Não há evidência de contaminação do PBDE's com a regulação dessa enzima. Uma hipótese para o aumento na atividade na dose maior de BDE-209 é via regulação dos hormônios tireoidianos, uma vez que há evidências de que o poluente possa mimetizar seus efeitos.

Finalmente, o presente estudo mostrou evidências do potencial tóxico do BDE-209 e TBF, trazendo novos dados que servirão para aumentar o *background* de informações toxicológicas destas moléculas, os quais podem ser utilizados na regulamentação do seu uso no Brasil.

5. CONCLUSÕES

- O BDE e TBF afeta o sistema antioxidante de células do fígado de *O. niloticus* de formas diferentes frente a exposição aguda e crônica;
- O BDE interfere com o equilíbrio óxido redutor celular após exposição subcrônica, levando a um estado de estresse oxidativo pró-oxidante em células do fígado de *O. niloticus*;
- Os danos histopatológicos mostraram que ambos os poluentes testados são hepatotóxicos;
- Alguns dados histopatológicos mostram fortes evidências de que tanto o TBF como o BDE são potenciais agentes carcinogênicos;
- Os dados ultraestruturais classificam os poluentes testados como citotóxicos e corroboram os dados de estresse oxidativo para a exposição subcrônica;
- Os danos ultraestruturais observados nos sinusóides e nos canálculos biliares mostram que a entrada dos poluentes e a saída dos mesmos ou de seus metabólitos são prejudiciais à integridade do tecido hepático;
- A exposição de curto ou médio prazo ao TBF e BDE leva a um aumento na atividade da acetilcolinesterase respectivamente em músculo e cérebro;
- Em termos gerais o TBF está mais associado a efeitos de curto prazo enquanto o BDE está mais relacionado com efeitos em médio prazo.

6. REFERÊNCIAS

A DIVISION OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (CAS). Databasecounter. Disponível em < <http://www.cas.org/content/counter>>. Acesso em 23/02/2016

AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Enzymatic and enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocytes induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 57, p. 290-295, 2004.

ALMEIDA, E. A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems. 1. ed. **CRC Press**, 2014

BENEDICT, R. T. et al. Debromination of polybrominated diphenyl ether-99 (BDE-99) in carp (*Cyprinus carpio*) microflora and microsomes. **Chemosphere**, v. 69, n. 6, p. 987–993, out. 2007.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P. AND WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Dis.**, p.22, v. 25-34, 1999.

BODIN, N.; BURGEOT, T.; STANISIERE, J.Y.; BOLQUENE, G.; MENARD, D.; MINIER, C.; BOUTET, I.; AMAT, A.; CHARD, Y.; BUDZINSKI, H. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. **Comp Biochem Physiol Toxicol: Pharmacol.**, v. 138 (4): p. 411-427, 2004.

BOELSTERLI, A. Mechanistic Toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. 2. ed. **Boca Raton**, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248–254, 1976.

BROWNE, E. P. et al. In vitro hepatic metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE 99) in Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*). **Aquatic toxicology** (Amsterdam, Netherlands), v. 92, n. 4, p. 281–7, 17 maio 2009.

CHEN J, LIUFU C, SUN W, SUN X, CHEN D. Assessment of the neurotoxic mechanisms of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in primary cultured neonatal rat hippocampal neurons includes alterations in second messenger signaling and oxidative stress. **Toxicol. Lett.** v. 192 p. 431–439. 2010

COLOMBO, G. et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. Journal of chromatography. B, **Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, 2 dez. 2015.

COSTA L.; GIORDANO G. Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. **Neurotoxicology**, v. 28 p. 1047–1067, 2007.

COSTA, L. G. et al. A mechanistic view of polybrominated diphenyl ether (PBDE) developmental neurotoxicity. **Toxicology letters**, nov. 2013.

COSTA, L. G. et al. A mechanistic view of polybrominated diphenyl ether (PBDE) developmental neurotoxicity. **Toxicology letters**, v. 230, n. 2, p. 282–94, 15 out. 2014.

COVACI, A. et al. Novel brominated flame retardants: a review of their analysis, environmental fate and behaviour. **Environment international**, v. 37, n. 2, p. 532–56, fev. 2011.

CRESTANI, M., MENEZES, C., GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., SPANEVELLO, R., SILVEIRA, A., GONÇALVES, F.F., ZANELLA, R., LORO, V.L. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere** v. 67 p.2305–2311, 2007.

D'ÁVILA, S. A indústria Petroquímica brasileira, Comciência, **Revista Eletrônica de jornalismo científico da SBPC**, Campinas, dezembro 2002.

DENG, J. et al. Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, n. 1, p. 87–95, fev. 2010.

DINGEMANS M.M.; VAN DEN BERG M.; WESTERINK R.H. Neurotoxicity of brominated flame retardants: (In) direct effects of parent and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers on the (developing) nervous system. **Environ. Health Perspective**. V.119 p. 900–907, 2011

DONG, H. et al. Identification of the metabolites of polybrominated diphenyl ether 99 and its related cytochrome P450s. **Journal of biomedical research**, v. 24, n. 3, p. 223–32, maio 2010.

ELLMANN, G.L.; COUTNEY, K.O.; ANDRES, V. & FEATHERSTONE, R.M.A. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** 7, 88-95. 1961.

EZECHIAŠ, M.; COVINO, S.; CAJTHAML, T. Ecotoxicity and biodegradability of new brominated flame retardants: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 110, p. 153–67, dez. 2014.

FENG, C. et al. Debrominated and methoxylated polybrominated diphenyl ether metabolites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to decabromodiphenyl ether. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 9, p. 1425–1434, set. 2010.

FENG, C. et al. Metabolic pathways of decabromodiphenyl ether (BDE209) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via intraperitoneal injection. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 536–44, mar. 2015.

FENG, C. et al. Relationship between BDE 209 metabolites and thyroid hormone levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic toxicology**. v. 122-123, p. 28–35, out. 2012a.

FENG, C. et al. Relationship between BDE 209 metabolites and thyroid hormone levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic toxicology** (Amsterdam, Netherlands), v. 122-123, p. 28–35, 15 out. 2012b.

FENG, C. et al. Relationship between BDE 209 metabolites and thyroid hormone levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic toxicology**. v. 122-123, p. 28–35, 15 out. 2012.

FISHBASE. *Oreochromis niloticus* Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/SpeciesSummary.php?ID=2&genusname=Oreochromis&speciesname=niloticus&AT=Oreochromis+niloticus&lang=English>> . Acesso em 23/02/2016

GALLO, J. B.; AGNELLI, J. A. M. Aspectos do comportamento de polímeros em condições de incêndio. **Polímeros**, v. 8, n. 1, p. 23–38, mar. 1998.

HALDÉN, A. N. et al. Oral exposure of adult zebrafish (*Danio rerio*) to 2,4,6-tribromophenol affects reproduction. **Aquatic toxicology**. v. 100, n. 1, p. 30–7, 1 out. 2010.

HAMERS, T. et al. In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 92, n. 1, p. 157–73, jul. 2006.

HOOPER, K. & MCDONALD, T.A. The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. **Environ Health Perspect.** v. 108(5), p. 387–392. 2000

IZABELA KANIA-KORWEL et al. 2,2',3,3',6,6'-Hexachlorobiphenyl (PCB 136) Atropisomers Interact Enantioselectively with Hepatic Microsomal Cytochrome P450 Enzymes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 6, p. 1295–1303, 2008.

JEMEC, A., DROBNE, D., TISLER, T., SEPCIĆ, K. Biochemical biomarkers in environmental studies - lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. **Environmental Science Pollution Research International**. V. 17, p. 571-581, 2010.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v.202, p.384-389, 1992.

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v.26, p.853-856, 1991.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6183–6188, 1976.

KELLY, J.M.; JANZ, D.M. Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill. **Aquat. Toxicol.**, v. 92, p. 240-249, 2009.

KIM, S. Y. et al. Transthyretin as a new transporter of nanoparticles for receptor-mediated transcytosis in rat brain microvessels. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 136, p. 989–96, 2015.

KOPP, E. K.; FROMME, H.; VÖLKE, W. Analysis of common and emerging brominated flame retardants in house dust using ultrasonic assisted solvent extraction and on-line sample preparation via column switching with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1241, p. 28–36, 8 jun. 2012.

LA GUARDIA, M. J.; HALE, R. C.; HARVEY, E. Evidence of Debromination of Decabromodiphenyl Ether (BDE-209) in Biota from a Wastewater Receiving Stream. BENEDICT, R. T. et al. Debromination of polybrominated diphenyl ether-99 (BDE-99) in carp (*Cyprinus carpio*) microflora and microsomes. **Chemosphere**, v. 69, n. 6, p. 987–93, out. 2007.

BROWNE, E. P. et al. In vitro hepatic metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE 99) in Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*). **Aquatic toxicology**, v. 92, n. 4, p. 281–7, 2009.

FENG, C. et al. Debrominated and methoxylated polybrominated diphenyl ether metabolites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to decabromodiphenyl ether. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 9, p. 1425–1434, 2010.

FENG, C. et al. Relationship between BDE 209 metabolites and thyroid hormone levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic toxicology**, v. 122-123, p. 28–35, 2012.

GALLO, J. B.; AGNELLI, J. A. M. Aspectos do comportamento de polímeros em condições de incêndio. **Polímeros**, v. 8, n. 1, p. 23–38, mar. 1998.

IZABELA KANIA-KORWEL et al. 2,2',3,3',6,6'-Hexachlorobiphenyl (PCB 136) Atropisomers Interact Enantio selectively with Hepatic Microsomal Cytochrome P450 Enzymes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 6, p. 1295–1303, 2008.

KIM, S. Y. et al. Transthyretin as a new transporter of nanoparticles for receptor-mediated transcytosis in rat brain microvessels. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 136, p. 989–96, 2015.

KOPP, E. K.; FROMME, H.; VÖLKE, W. Analysis of common and emerging brominated flame retardants in house dust using ultrasonic assisted solvent extraction and on-line sample preparation via column switching with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1241, p. 28–36, 8 jun. 2012.

TIAN, X. et al. Polychlorinated biphenyls and their different level metabolites as inhibitors of glutathione S-transferase isoenzymes. **Chemico-biological interactions**, v. 198, n. 1-3, p. 1–8, 25 jun. 2012.

LETCHER, R. J.; MARTEINSON, S. C.; FERNIE, K. J. Dietary exposure of American kestrels (*Falco sparverius*) to decabromodiphenyl ether (BDE-209) flame retardant: uptake, distribution, debromination and cytochrome P450 enzyme induction. **Environment international**, v. 63, p. 182–90, fev. 2014.

LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, v.233, p.346–357, 1994.

MAGNI, P., DE FALCO, G., FALUGI, C., FRAUZOU, M., MONTEVERDI, M., PERRONE, E., SQUO, M., BOLOGNESI, C. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano. **Environmental Pollution**. V. 142, p. 65–72, 2006.

MUNSCHY, C. et al. Classic and novel brominated flame retardants (BFRs) in common sole (*Solea solea* L.) from main nursery zones along the French coasts. **The Science of the total environment**, v. 409, n. 21, p. 4618–27, out. 2011.

OLSEN, C. M. et al. Brominated phenols : characterization of estrogen-like activity in the human breast cancer cell-line MCF-7. v. 129, p. 55–63, 2002.

PEAKALL, D.W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicol. Ecotoxicol. News**, v.1, p. 55-60, 1994.

RABITTO, I.S., ALVES COSTA, J.R.M., SILVA DE ASSIS, H.C., PELLETIER, E., AKAISHI, F.M., ANJOS, A., RANDI, M.A.F., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicol Environ Saf.** V. 60, p. 147–156. 2005

RANG, H. P.; DALE, H. P. Farmacologia. 7. ed. **Campus**, 2012

RÍOS, J. C. et al. Tribromophenol induces the differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 17, n. 5-6, p. 635–641, 2003.

SEDLAK, J. e LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.

SHI, Z. et al. Levels of tetrabromobisphenol A, hexabromocyclododecanes and polybrominated diphenyl ethers in human milk from the general population in Beijing, China. **The Science of the total environment**, v. 452-453, p. 10–8, 2013.

SILVA DE ASSIS, H.C. **Der Einsatz von Biomarkern zur Summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen**. Thesis. Berlin Technical University, Germany. p.99, 1998

STENTIFORD, G. D. et al. Histopathological survey of potential biomarkers for the assessment of contaminant related biological effects in species of fish and shellfish collected from Kuwait Bay, Arabian Gulf. **Marine environmental research**, v. 98, p. 60–7, jul. 2014.

STENTIFORD, G. D.; MASSOUD, M. S.; AL-MUDHHI, S. Histopathological survey of potential biomarkers for the assessment of contaminant related biological effects in species of fish and shellfish collected from Kuwait Bay, Arabian Gulf. **Marine environmental research**, v. 98, p. 60–7, 2014.

TIAN, X. et al. Polychlorinated biphenyls and their different level metabolites as inhibitors of glutathione S-transferase isoenzymes. **Chemico-biological interactions**, v. 198, n. 1-3, p. 1–8, 2012.

TOMY, G. T. et al. Bioaccumulation, Biotransformation, and Biochemical Effects of Brominated Diphenyl Ethers in Juvenile Lake Trout (*Salvelinus namaycush*). **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 5, p. 1496–1504, 2004.

TROITZCH JH. International plastics flammability handbook: principles, regulations, testing and approval. 2nd ed. Munich, Germany: **HanserPublishers**; 1990.

TUE, N. M. et al. Release of chlorinated, brominated and mixed halogenated dioxin-related compounds to soils from open burning of e-waste in Agbogboshie (Accra, Ghana). **Journal of hazardous materials**, v. 302, p. 151–7, 25 jan. 2016.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, fev. 2003.

VETTER, W. et al. Detailed analysis of polybrominated biphenyl congeners in bird eggs from Norway. **Environmental pollution** (Barking, Essex : 1987), v. 156, n. 3, p. 1204–10, dez. 2008.

Viberg H, Fredriksson A, Jakobsson E, Orn U, Eriksson P. Neurobehavioral derangements in adult mice receiving decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) during a defined period of neonatal brain development. **Toxicol. Sci.** v. 76 p. 112–120. 2003a

Viberg H, Mundy W, Eriksson P. Neonatal exposure to decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) results in changes in BDNF, CaMKII and GAP-43, biochemical substrates of neuronal survival, growth, and synaptogenesis. **Neuro Toxicology**. v. 29 p.152–159. 2008

WORLD HEALTH ORGANIZATION – International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 155: **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva; 1993

WU, N. et al. Human Exposure to PBDEs: Associations of PBDE Body Burdens with Food Consumption and House Dust Concentrations. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 5, p. 1584–1589, 2007.

ZHANG, M.; BUEKENS, A.; LI, X. Brominated flame retardants and the formation of dioxins and furans in fires and combustion. **Journal of hazardous materials**, v. 304, p. 26–39, 5 mar. 2016.

ZHANG, W. et al. A multi-biomarker risk assessment of the impact of brominated flame retardant-decabromodiphenyl ether (BDE209) on the antioxidant system of earthworm *Eisenia fetida*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 297–304, jul. 2014a.

ZHANG, W.-F. et al. Determination of polybrominated diphenyl ethers in river water by combination of liquid–liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Chinese Chemical Letters**, abr. 2014b.

ZHAO, A.; LIU, H.; ZHANG, A.; Effect of BDE-209 on glutathione system in *Carassius auratus*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 35–9, 2011.

ZHU, B. et al. Effect of combined exposure to lead and decabromodiphenyl ether on neurodevelopment of zebrafish larvae. **Chemosphere**, v. 144, p. 1646–54, fev. 2016.